

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie
Studijní obor Parazitologie



Bc. Michaela Pavlasová

Vývoj pohlavních znaků u flebotomů

Development of sexual characteristics of phlebotominae sand flies

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Jan Votýpka, PhD.

Praha 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2014

Michaela Pavlasová

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala panu docentu Janu Votýpkovi za jeho pomoc, velkou trpělivost a cenné rady při psaní této práce. Důležité poděkování patří také paní Věře Volfové za pomoc a vstřícnost při experimentech. Dále bych také ráda poděkovala celému týmu laboratoře za velmi přátelský přístup.

Seznam zkratk

<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
<i>S.</i>	<i>Sergentomyia</i>

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na studium vývoje pohlavních znaků u flebotomů a vliv velikosti těla na některé determinační znaky, a je proto rozdělena na dva tématické okruhy.

První tematická část této práce je věnována rotaci vnějších genitálií samců vybraných podrodů flebotomů a jejich zástupců: *Adlerius* (*Phlebotomus arabicus*), *Larroussius* (*Phlebotomus orientalis* a *Phlebotomus tobbi*), *Euphlebotomus* (*Phlebotomus argentipes*), *Paraphlebotomus* (*Phlebotomus sergenti*), *Phlebotomus* (*Phlebotomus papatasi*), *Lutzomyia* (*Lutzomyia longipalpis*) a *Sergentomyia* (*Sergentomyia schwetzi*). V této části byla zjišťována a porovnávána doba trvání rotace genitálií u uvedených druhů. Byla rovněž měřena doba od vylíhnutí dospělců po začátek rotace a závislost doby rotace na denní době líhnutí dospělců. Doby trvání rotace včetně časů od začátku rotace se u některých podrodů výrazně lišily, od *S. schwetzi* s nejkratší průměrnou dobou rotace 12 hodin až po *P. sergenti* s nejdelší průměrnou dobou rotace 32 hodin.

Dále byly srovnávány rotace u dvou druhů v rámci podrodu *Larroussius*: *P. orientalis* a *P. tobbi*. I zde se doby trvání rotace výrazně lišily, což nepotvrzuje, že by rotace byly specifické pro daný podrod. Byl také sledován vliv teploty na dobu trvání rotace u *P. papatasi* při 20 a 25 °C, přičemž rozdíly v dobách nebyly významné a u nižší teploty byl zaznamenán pouze vyšší rozptyl hodnot. Rotace u samců flebotomů se jevila jako druhově specifická a nezávislá na teplotě a denní době líhnutí dospělců.

Druhé téma je věnováno vlivu faktorů na velikost těla samců flebotomů druhu *P. arabicus*, převážně vlivu teploty na velikost vnějších genitálií a křídel, přičemž samci byli po celý svůj larvální vývoj chováni v odlišných teplotách 20, 25 a 28 °C. Samci chovaní při 20 °C měli nejdelší larvální vývoj, což se projevilo i největšími rozměry křídel i coxitů. Samci chovaní při 25 a 28 °C měli vývoj výrazně kratší a křídla i coxity menší, nicméně rozdíl mezi 25 a 28 °C nebyl podstatně výrazný. Potvrdil se však vliv teploty na velikost těla.

Klíčová slova: *Phlebotomus*, samčí genitálie, rotace, vliv teploty, velikost křídel

ABSTRACT

This thesis is focused on study of phlebotomus generative attributes development and body dimension influence for some determinant notes therefore is divided into two thematic parts.

First thematic part of thesis is heading to rotation of outer genitalia of chosen phlebotomus subgenus males and their representatives: *Adlerius* (*Phlebotomus arabicus*), *Larroussius* (*Phlebotomus orientalis* and *Phlebotomus tobbi*), *Euphlebotomus* (*Phlebotomus argentipes*), *Paraphlebotomus* (*Phlebotomus sergenti*), *Phlebotomus* (*Phlebotomus papatasi*), *Lutzomyia* (*Lutzomyia longipalpis*) and *Sergentomyia* (*Sergentomyia schwetzi*). In this part was discovered and compared time of station of genitalia for chosen subgenera. Also the time from emergence of adults to rotation and rotation time dependence on adults daytime eclosion was measured. Times of rotation time duration including that of times from rotation beginning were at subgenera expressively different, from *S. schwetzi* with the shortest rotation time of 12 hours to *P. sergenti* with the longest with average time rotation of 32 hours.

Further were compared rotations of two genera within subgenus *Larroussius*: *P. orientalis* and *P. tobbi*. Here also were each rotation times expressively different that do not validate the rotation should be specific for given subgenus. Observed was also time influence on rotation time duration on *P. papatasi* at 20 and 25 °C whereas differences in times were not significant and at lower temperature was noted only higher dispersion of values. Rotation of phlebotomus males appeared as genus specific and independent on temperatures and adults daytime eclosion.

Second thematic part is heading to factors that influence body dimensions of phlebotomus males within genus *P. arabicus*, mainly temperature influence on dimensions of outer genitals and wings whereas males were bred all their larval development at different temperatures 20, 25 and 28 °C. Males bred at 25 and 28 °C had development significantly shorter and wings and coxites smaller nevertheless difference between 25 and 28 °C was not significantly expressive. The influence of temperature on body dimension was however confirmed.

Key words: *Phlebotomus*, male genitalia, rotation, temperature influence, wing size

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
Téma I.		
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1	Životní cyklus flebotomů.....	10
2.2	Líhniště flebotomů.....	11
2.3	Stavba samčích genitálií flebotomů.....	14
2.4	Rotace vnějších genitálií flebotomů.....	15
2.5	Flebotomové, jejich podrody a významní zástupci.....	16
2.5.1	Phlebotomus.....	17
2.5.2	Lutzomyia.....	19
2.5.3	Sergentomyia.....	19
3.	MATERIÁL A METODIKA.....	20
3.1	Použité druhy flebotomů.....	20
3.2	Chov flebotomů.....	20
3.3	Měření rotace vnějších genitálií samců flebotomů.....	21
3.4	Schéma pokusů.....	21
3.4.1	Srovnání doby trvání a začátku rotace u jednotlivých zástupců podrodů.....	22
3.4.2	Srovnání doby rotace v rámci podrodu.....	22
3.4.3	Závislost denní doby líhnutí na době rotace.....	22
3.4.4	Závislost doby rotace na teplotě.....	23
3.5	Vyhodnocení.....	23
4.	VÝSLEDKY.....	24
4.1	Srovnání doby trvání a začátku rotace u jednotlivých zástupců podrodu.....	24
4.2	Srovnání doby rotace v rámci podrodu.....	30
4.3	Závislost denní doby líhnutí na době rotace.....	31
4.4	Závislost doby rotace na teplotě.....	32
Téma II.		
5.	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	37
5.1	Taxonomie flebotomů.....	37
5.2	Geometrická morfometrie.....	38
5.3	Faktory ovlivňující vnitrodruhovou variabilitu.....	39
6.	MATERIÁL A METODIKA.....	42
6.1	Chov flebotomů.....	42
6.2	Měření velikosti křídel a pohlavních orgánů samců.....	42
7.	VÝSLEDKY.....	45
7.1	Srovnání velikosti křídel.....	45
7.2	Srovnání velikosti genitálií.....	47
8.	DISKUZE.....	50
9.	ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ.....	55
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56

1. ÚVOD

Flebotomové (řád Diptera, čeleď Psychodidae, podčeleď Phlebotominae) jsou hematofágní hmyz. Krev sají pouze samice, obě pohlaví se pak živí cukernými šťávami nebo medovicí. Flebotomové se vyskytují v tropickém a subtropickém pásmu celého světa: ve Starém Světě se vyskytuje rod *Phlebotomus* a v Novém světě rod *Lutzomyia*. Některé druhy těchto dvou rodů flebotomů jsou významnými přenašeči nemocí jako např. bartonelózy, leishmaniózy a některých virových onemocnění. *Sergentomyia* je dalším starosvětským rodem, který však nesaje primárně na savcích, ale především na plazech, a není proto z medicínského hlediska tolik významný.

Studium flebotomů z hlediska různých oborů v poslední době nabývá čím dál většího významu a je vynakládáno velké úsilí ve snaze zabránit šíření a vývoje těchto vektorů. Ačkoliv existují způsoby, jak omezit jejich vývoj, aby bylo možné je aplikovat, je nejdříve nutné místa jejich vývoje najít. Larvy flebotomů mají terestrický vývoj, který probíhá na skrytých místech, a proto je velmi nesnadné tato místa lokalizovat. Hledání líhnišť ale usnadňuje existence rotace vnějších genitálií samců, které probíhá určitou dobu po vylíhnutí. Jedná se o otočení genitálií o 180°, po jehož dokončení jsou samci schopni páření. Při hledání líhnišť flebotomů se používají různé pasti, ze kterých se nachytaní samci analyzují a stav otočení, respektive neotočení jejich genitálií může naznačit blízkost líhniště. Je tedy velmi důležité znát charakter a průběh rotace pro využití této metody v přirozených podmínkách.

Mimo vrozených aspektů ovlivňuje rotaci vnějších genitálií nejspíše i řada dalších faktorů, které mají vliv i na další funkce a tělesnou stavbu včetně velikosti těla. Patří sem abiotické i biotické faktory, avšak jejich vliv na rotaci genitálií samců flebotomů není dosud známý.

Tato diplomová práce se zabývá dvěma příbuznými tématy. Prvním, rotací vnějších genitálií u samců vybraných druhů flebotomů a faktory ovlivňující rotaci, a tématem druhým, zabývajícím se velikostí částí těla flebotomů (vnějšími genitáliemi a křídly samců) a faktory ovlivňujícími velikost těla.

Cíle této práce byly:

- Sledovat a měřit rotaci vnějších genitálií u samců vybraných zástupců podrodů flebotomů: *Adlerius* (*Phlebotomus arabicus*), *Larroussius* (*Phlebotomus orientalis* a *Phlebotomus tobbi*), *Euphlebotomus* (*Phlebotomus argentipes*), *Paraphlebotomus* (*Phlebotomus sergenti*), *Phlebotomus* (*Phlebotomus papatasi*), *Lutzomyia* (*Lutzomyia longipalpis*) a *Sergentomyia* (*Sergentomyia schwetzi*).
- Zjistit, zda jsou rozdíly v rotaci i mezi druhy v rámci jednoho podrodu (*Adlerius* – *P. orientalis* a *P. tobbi*).
- Zjistit, jaké jsou rozdíly v době rotace mezi jednotlivými podrody a jestli vliv denní doby líhnutí a teplota během larválního vývoje ovlivňují tuto rotaci.
- Porovnat velikosti vnějších genitálií a křídel samců druhu *P. arabicus* v různých teplotních podmínkách.

Téma I.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Životní cyklus flebotomů

Flebotomové (podčeleď Phlebotominae) se vyskytují v subtropických a tropických oblastech celého světa. Protože mají velký medicínský význam jako vektoři různých onemocnění (leishmanióza, bartonelóza, virová onemocnění), je vynaloženo mnoho sil k omezení šíření těchto nemocí i k samotnému potlačení jejich výskytu.

Flebotomové se liší svým terestrickým vývojem larev od většiny skupin dvoukřídlého hematofágního hmyzu z podřádu Nematocera. Dospělci nejsou dobrými letci, během dne odpočívají na skrytých místech a aktivní jsou nejčastěji za soumraku, kdy vyhledávají hostitele (Killick-Kendrick, 1999). Pouze samice sají krev, která je využita jako zdroj proteinů pro vývoj vajec, přičemž dochází k synchronizaci sání krve a vývoje folikulů v ovariolách a následné snůšky. Tento proces tvorby vajec se nazývá gonotrofický cyklus. Ačkoliv sání krve je pro většinu flebotomů obligátní, je známo několik druhů, kteří nemusí pro první snůšku vajec sát krev. Jedná se o tzv. autogenní druhy, kterým tato strategie poskytuje možnost rychlého naklazení vajec v nepříznivých podmínkách či v nepřítomnosti hostitelů. Autogenní vývoj vajec umožňuje mimo jiné i dostatečná larvální výživa (Chelbi et al., 2007), přesto je i v takovéto snůšce často méně vajec než v běžné snůšce, která obsahuje 30 až 70 vajec v závislosti na objemu nasáté krve (Killick-Kendrick, 1999).

Larvy se líhnou z nakladených vajec v závislosti na druhu flebotoma a teplotě prostředí po 7 až 10 dnech (Killick-Kendrick, 1999) a prodělávají čtyři larvální stádia. Vzhledem ke skrytému způsobu života máme o ekologii larev flebotomů mnohem méně poznatků, než například o životě komářích larev. Larvy flebotomů se vyvíjejí v puklinách půdy, norách hlodavců, termitišťích, chlévech, ptačích hnízdech a jiných půdních či stromových dutinách (Moncaz et al., 2012, Moncaz et al., 2014, Feliciangeli et al., 2004, Bettini, 1989, 1988, 1986) a je tedy velmi nesnadné nejenom tato místa prozkoumat, ale nejprve je i najít. Navíc se v takovýchto místech vyskytují larvy pouze v malých počtech a jen výjimečně je nalezeno velké líhniště (Feliciangeli, 2004, Singh et al., 2008).

Nároky larev jsou hlavně na dostatek organického materiálu, kterým se živí, relativně vysoká a stálá vlhkost vzduchu a pravděpodobně stálá okolní teplota. Stálost vnějších podmínek zde nejspíš hraje zásadní roli, ačkoliv některé druhy snášejí i větší výkyvy teplot. Různé druhy flebotomů preferují různé složení potravy a substráty, což může znamenat, že se každý druh vyvíjí v trochu odlišném prostředí (Wermelinger et al., 2001). Lokality, ve kterých se vyskytují líhniště, jsou často různě rozptýlené v závislosti na místních podmínkách jako např. četnost srážek, teplota, dostupnost hostitelů a vhodnost terénu (Young et al., 1992).

Larvy se kuklí zhruba po 3 – 4 týdnech od vylíhnutí a stádium kukly trvá 7 – 10 dní. Jako první se líhnou samci, samice často až o několik dní později. Dospělci zůstávají v blízkosti svého líhniště, obvykle v okruhu několika set metrů a výjimečně až kilometru (Killick – Kendrick, 1999).

2.2 Líhniště flebotomů

Protože jsou rody *Phlebotomus* a *Lutzomyia* významní z medicínského hlediska, je vynaloženo velké úsilí zamezit jejich výskytu. Ačkoliv se velmi intenzivně zkoumají a vyvíjejí metody biologického a chemického boje proti flebotomům a v laboratorních podmínkách se je daří aplikovat, v přírodě jsou zatím téměř neproveditelné. Nejúčinnějším se nepochybně jeví snaha o zamezení vývoje nedospělých stádií, tedy zacílení na místa, kde se vyvíjejí larvy, tak jako je tomu například v boji s komáry apod. Oblasti, kde se vyskytují líhniště flebotomů, bývají velmi rozsáhlá a z lidského hlediska jednotvárná, přesto se flebotomové nevyskytují na celém takovém území rovnoměrně, ale jen na malých a mozaikovitě rozptýlených habitatech (Alexander et al., 2003). Tato místa jsou ale obtížně vyhledatelná, a proto se zatím veškeré způsoby boje proti flebotomům zaměřují na dospělé (Feliciangeli, 2004).

Metody, které by jednoznačně vedly k nalezení líhnišť, zatím neexistují. Jedná se převážně o hledání vhodných biotopů a sbírání vzorků pro detekci larev, což bývá na většině lokalit neúspěšné. Takováto území bývají často velmi rozsáhlá a neexistují bližší data, která by dokazovala, že se flebotomové specializují na konkrétní biotopy (Faiman et al., 2012). Dosavadní poznatky jsou poměrně obecného rázu jako např., že některá líhniště, nejčastěji ve Starém světě, se nachází v aridních oblastech, v humidních oblastech se flebotomové vyvíjejí spíše v Novém světě (Mauricio et al., 2000). Tato zjištění určitě poskytují podklady

pro další zkoumání, nicméně jsou příliš nekonkrétní. Navíc řada druhů flebotomů pravděpodobně ani není příliš specializovaných a využívají celou škálu biotopů a mikrobiotopů. Nejspíše nejde ani tolik o preferenci určitých podmínek, ale spíše o to, jaké prostředí je v dané oblasti k dispozici (Alexander et al., 2003).

Vylíhnutí dospělci nelétají na velké vzdálenosti a drží se blízko svých líhnišť nebo přečkávají na vhodných místech. Vzhledem k malé disperzi dospělců se dají částečně vystopovat pomocí různých např. lepových a světelných pastí, které se rozmísťují na místa, kde se očekává výskyt flebotomů. Nicméně tato metoda určí pouze oblast výskytu, nikoli konkrétní místo vývoje larev. Pro vyhledání larev v přírodě slouží následující hlavní metody:

- 1) Hledání potenciálních míst vývoje larev jako je např. hrabanka, nory hlodavců, vhodný typ půdy atd. a následné prohlížení vzorků půdy pod lupou.
- 2) Sbírání vzorků půdy a dalších substrátů a získávání larev pomocí flotace nebo vysušení.
- 3) Sbírání vzorků půdy a dalších substrátů, jejich inkubace za vhodných podmínek pro vývoj v dospělce.
- 4) Rozmísťování lepových, světelných nebo jiných pastí na potenciální líhniště k odchytu dospělců.

Dříve se využívala metoda sběru vzorků půdy a dalších vhodných substrátů a vyhledávání larev a kukel nebo se vzorky půdy inkubovaly a čekalo se, zda se objeví dospělci. Tato metoda je ale velmi obtížná a časově náročná a jen malý podíl larev se vyvine v dospělce (Feliciangeli, 2004). Přestože se právě díky těmto metodám slavily první úspěchy (McCombie-Young et al., 1926, Hanson, 1961) při vyhledávání líhnišť, dnes se již tato metoda téměř nevyužívá.

Flotační metoda se využívá dodnes a docela úspěšně. Umožňuje rychleji vyšetřit větší objem půdy, hrabanky apod., a přestože je vůči larvám a kuklám poměrně agresivní, je efektivní. Ve studii Alencaret al. (2011) 65 % takto získaných larev dosáhlo dospělosti, oproti 28 % přeživších larev při inkubaci substrátu (Hanson, 1961). Morfologická identifikace druhů flebotomů je založena pouze na dospělcích, proto je důležité, aby se získané larvy dokázaly úspěšně vylíhnout v dospělce.

V dnešní době se často využívá metody odchyty dospělců do různých typů pastí. Zda se jedná o blízkost líhniště či pouze místo k odpočinku, lze určit podle samců nachytných do pastí. Podle stavu vývoje a polohy (tj. rotace) jejich pohlavních orgánů lze totiž poznat, zda se jedná o mladého (nedávno vylíhnutého) nebo staršího (ke kopulaci připraveného) samce. V blízkosti líhnišť se vyskytují mladí i starší samci, na místech odpočinku nalézáme výhradně samce dospělé. Podíl mladých a dospělých samců nám proto napoví, zda se může jednat o místa vývoje larev. Metodicky je také podstatné odchyťovat dospělé po několik po sobě následujících dní, protože se podíl mladých samců může každým dnem postupně zvyšovat, z čehož vyplývá, že během prvního dne se zde nacházeli i odpočívající (staří) samci, a následující dny se zde objevovali převážně mladí samci. Právě takováto situace naznačuje blízkost líhniště. Feiman et al. (2012) poukazují na fakt, že v rámci dlouhodobých odchytů provedených na několika lokalitách se postupně snižoval celkový počet odchycených flebotomů. Pravděpodobně docházelo k opakovanému využívání stále stejného místa odpočinku, proto byli zejména starší samci vychytáni převážně první den. Dalším ukazatelem na blízkost líhniště se zdá být vysoký podíl nachytných samců vůči samicím. Samci se vzdalují od líhnišť méně než samice, a proto je v okolí líhnišť vyšší podíl samců, oproti místům odpočinku v blízkosti hostitelů, kde je vyšší podíl samic (Orshan et al., 2010).

Zdaleka ne u všech druhů a populací flebotomů se nutně musí líhniště vyskytovat v okolí míst odpočinku dospělců. Larvy *Lutzomyia umbratilis* vyskytující se v lesním prostředí Amazonie se vyvíjejí v půdě u báze kmenů stromů, přičemž místa odpočinku dospělců jsou neznámá (Alencar et al., 2011). Stejně tak je tomu i u druhů *L. shannoni*, *L. longipalpis* a několika dalších (Hanson, 1961). Na druhou stranu, *L. longipalpis* a některé druhy jako *L. intermedia* a *L. migonei* se v Brazílii často vyvíjejí v blízkosti lidských obydlí, převážně tam, kde se vyskytují domácí zvířata (chlévy apod.), což poskytuje zázemí i potravu pro dospělé a umožňuje přenos leishmaniózy nezávisle na sylvatickém cyklu (Vieira et al., 2012).

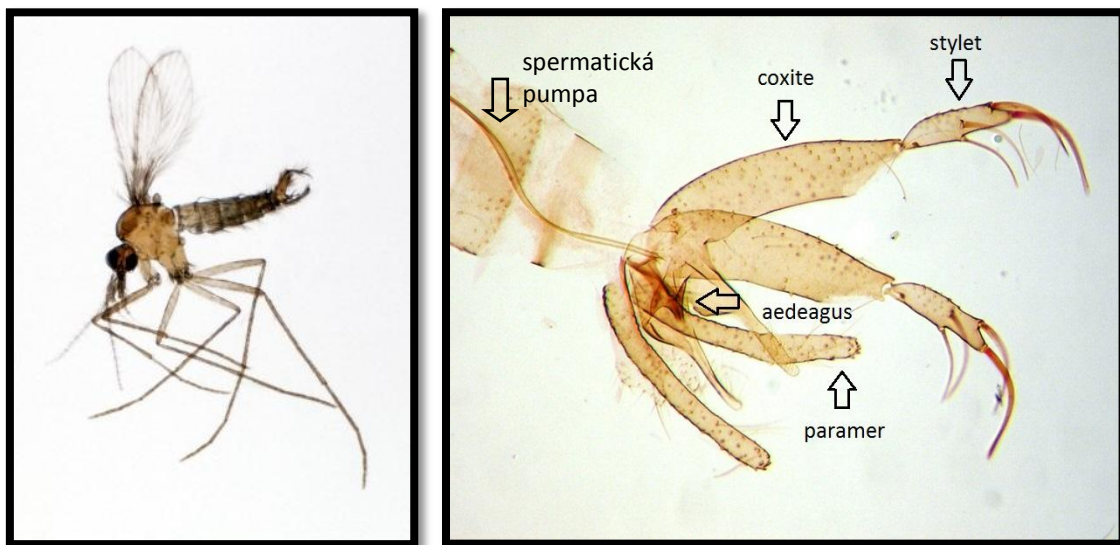
Dosavadní poznatky založené zejména na odchytu dospělců nám umožňují vytipovat oblasti s výskytem líhnišť. Avšak oblasti obývané flebotomy jsou většinou velmi rozlehlá a konkrétních možností, kde by se larvy mohly vyvíjet, je mnoho. Základem pro hledání líhnišť tedy stále zůstává systematické vyhledávání vhodných lokalit a mikrohabitatů a následná aplikace některé ze základních metod.

2.3 Stavba samčích genitálií flebotomů

Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, stavba a stupeň vývoje samčích genitálií může významnou měrou napomoci při identifikaci líhnišť flebotomů.

Samčí genitálie jsou nápadné struktury na konci abdomenu a poskytují zásadní taxonomickou informaci. Pohlavní orgány flebotomů jsou symetrické (platí pro všechna Diptera, ale obecně u hmyzu jsou samčí genitálie převážně asymetrické), což přitahuje jistou pozornost. Jako genitálie zde označujeme i struktury, které slouží k přichycení nebo stimulaci samice (Huber et al., 2007).

Samčí genitálie se skládají z vnitřních a vnějších orgánů. K hlavním vnitřním orgánům patří dvojice varlat a pohlavní vývody, které vyúsťují ven z těla kopulačním orgánem zvaným aedeagus. Ten je obklopen tzv. vnějšími „klíštky“, které při kopulaci slouží k fixaci zadečku samice. Klíštky tvoří hlavně párové coxity, stylety a paramery (Snodgrass, 1965). Některé tyto orgány bývají druhově specifické a slouží jako taxonomické znaky.



Obr. 2-1: Samec rodu *Lutzomyia* (převzato a upraveno z Liverpool School of Tropical Medicine courtesy of A Stich)

Obr. 2-2: Detail samčích genitálií rodu *Lutzomyia* (převzato a upraveno z Dantas-Torres, 2008)

2.4 Rotace vnějších genitálií samců

Stejně tak jako u ostatních dvoukřídlých nejsou ani samci flebotomů ihned po vylíhnutí z kukly připraveni kopulovat. Samci se líhnou s neotočenými (nerotovanými) vnějšími genitáliemi. Ty se otáčí o 180° podél osy těla v průběhu několika hodin až dní od vylíhnutí. Tedy vývojově ventrální části jako coxity, stylet, paramery a aedeagus se přesunou na dorzální stranu a původně dorzální laterální laloky a cerci se dostanou do polohy ventrální (Ilango et al., 2000). Samci s ještě nerotovanými genitáliemi jsou proto považováni za čerstvě vylíhlé jedince (Faiman et al., 2012). Doba, po kterou trvá toto rotování, může být často značně rozlišná a druhově specifická.

U některých nematocerních dipter může rotace probíhat oběma směry pomocí specializovaných svalů, ale u flebotomů se pravděpodobně otáčí pouze jedním směrem (Dordel, 1973), a to levotočivě.



Obr. 2-4: Samec *P. sergenti* s nerotovanými genitáliemi (převzato a upraveno Faiman, Kirstein et al., 2012)



Obr. 2-4: Samec *P. sergenti* s plně rotovanými genitáliemi (převzato a upraveno Faiman, Kirstein et al., 2012)

Plně rotované genitálie jsou nutností pro úspěšné páření. Ačkoliv byly pozorovány pokusy o páření samců s genitáliemi otočenými jen o 135° tyto byly ve většině případů neúspěšné, naopak samci s rotovanými genitáliemi jen o něco méně než 180° se již mohli pářit (Provost et al., 1961). Navzdory otočení genitálií po vylíhnutí, přičemž tato pozice

zůstává trvale , při páření dochází k dalšímu otočení genitálií , ale pouze k dočasnému . K otočení dochází v místě 7. tergitu o 90° a 8. sternitu o 180° a toto otočení již může probíhat oběma směry (Huber et al., 2007, Bray et al., 2010).



Obr. 2-5: Pozice při páření flebotomů.

Samice zobrazena bíle, samec je šedý
(převzato a upraveno Huber et al.,
2007)

Podrobnější poznatky o rotaci genitálií u flebotomů nejsou známy, neboť se jimi téměř žádné studie nezabývají. Ve většině studií jsou zmiňovány pouze nematocerní diptera obecně, a i mezi nimi jsou podstatné rozdíly. Komárům a některým dalším skupinám se věnují některé studie zvlášť, ale od nich se flebotomové odlišují nejenom svým terestrickým vývojem, tedy prostředím kde žijí, ale i faktory, které na ně působí. Komáří larvy se vyvíjejí ve vodě a po vylíhnutí se rychle mění jejich prostředí. Možná z toho důvodu je rotace genitálií u komárů závislá na teplotě, vlhkosti a na dalších vnějších faktorech (Dahan et al., 2014) oproti flebotomům, kteří, jak již bylo uvedeno, se vyvíjejí skrytě ve stabilních podmínkách.

2.5 Charakteristika vybraných podrodů flebotomů a významní zástupci

Vzhledem k tomu, že jsem ve své práci zvolila porovnání rotace genitálií u samců několika druhů flebotomů náležících do několika podrodů, uvádím zde velice stručný popis nejdůležitějších zástupců.

Do podčeledi Phlebotominae (z čeledi Psychodidae) patří několik rodů: *Phlebotomus* a *Sergentomyia* žijící ve Starém světě a *Lutzomyia* žijící v Novém světě.

2.5.1 *Phlebotomus*

Rod *Phlebotomus* je rozdělen na několik podrodů, a to podle taxonomických znaků, jako jsou žilky na křídlech, poměr mezi tykadly a palpy a chlupy na styletu a coxitu. Podrodů je 11 (*Adlerius*, *Larroussius*, *Euphlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Kasaulius*, *Anaphlebotomus*, *Synphlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaelophlebotomus*) (Lewis, 1982). A v následujícím výčtu se budu zabývat prvními pěti podrody a jejich významnými zástupci, které dlouhodobě chováme v naší laboratoři.

Podrod *Adlerius*

Podrod *Adlerius* obsahuje asi 20 známých druhů flebotomů. Z epidemiologického hlediska se jedná o méně významný podrod, i když některé druhy jsou vektory kutánní leishmaniózy a o některých dalších druzích se spekuluje jako o vektorech viscerální leishmaniózy.

Phlebotomus arabicus se vyskytuje v některých oblastech východní Afriky a Středního Východu, kde je vektorem kutánní leishmaniózy (*Leishmania tropica*) v antopozoonotickém koloběhu (Svobodova et al., 2006). Žije spíše v suchých bezlesých habitatech, nebo i v suchých podrostech a lesích, ataké v horských lesích. Patří mezi větší flebotomy a vyznačuje se velmi štětinatým coxitem (Lewis, 1982).

Podrod *Larroussius*

Několik druhů z podrodu *Larroussius* je významným vektorem viscerální leishmaniózy v Asii a v Africe, kde se vyskytují i ve vysokých nadmořských výškách. Některé druhy tohoto podrodu se vyskytují ale i v Evropě. Celkem je známo přes 20 druhů.

Phlebotomus orientalis pochází z východní Afriky a objevuje se běžně i na Arabském poloostrově. Navzdory svému obrovskému významu jako vektoru viscerální leishmaniózy, nemoci kala-azar (původcem je *Leishmania donovani*), není o jeho ekologii příliš moc známo (Kirk et al., 1955). Běžně se vyskytuje v horských travnatých oblastech, ale ani výskyt v nížinách, savanách, akáciových lesích a v blízkosti vesnic a měst není žádnou výjimkou

(Elnaiem, 2011) a dospělci *P. orientalis* se nachází i v lidských obydlích. I přestože je tento druh silně antropofilní, není zatím jasné, zda kala-azar koluje pouze jako antroponóza nebo též jako zoonóza. Mnoho studií zabývá výskytem *P. orientalis*, který se vyznačuje svou rozmanitostí. Tento výskyt je navíc ovlivněn charakterem terénu, velikostí areálu výskytu kala-azar a v neposlední řadě i sezonalitou *P. orientalis* (Elnaiem, 2011, Lambert et al., 2002, Elnaiem et al., 1998).

Podrod *Euphlebotomus*

Podrod *Euphlebotomus* obsahuje nejméně 12 popsaných druhů žijících převážně na území Asie včetně Indonésie a některé z nich jsou významnými vektory viscerální leishmaniózy.

Pod označením *Phlebotomus argentipes* se pravděpodobně skrývá komplex blízce příbuzných druhů vyskytující se v Indii, jihovýchodní Asii a Indonésii. Na Indickém subkontinentu je významným vektorem viscerální leishmaniózy (kala-azar, *Le. donovani*) (Killick-Kendrick, 1990). Vyžaduje převážně vlhké prostředí, jako jsou lesy a vysokou okolní teplotu. V důsledku preferencí těchto podmínek a střídání monzunových období, vykazuje *P. argentipes* značnou sezonalitu (Picado et al., 2010).

Podrod *Paraphlebotomus*

Do podrodu *Paraphlebotomus* patří několik druhů, které jsou vektory kutánní nebo viscerální leishmaniózy, celkově podrod skýtá kolem 14 druhů s geografickým rozšířením na území Asie, Afriky i Středomoří.

Phlebotomus sergenti je důležitým vektorem antroponotické kutánní leishmaniózy (původcem je *Leishmania tropica*) (Killick-Kendrick, 1990). Geografické rozšíření *P. sergenti* je velmi široké a zahrnuje jak oblasti ve Středomoří, Blízkém východě, Arabském poloostrově, Střední Asii a Indii, a přesahuje oblasti výskytu *Le. tropica* (Depaquit et al., 2002), navíc tento druh vykazuje značnou vnitrodruhovou variabilitu (Dvorak et al., 2011).

Podrod *Phlebotomus*

Podrod *Phlebotomus* se vyskytuje v rozmanitých podmínkách od velmi suchých přírodních habitatů až po lidská obydlí v tropických a subtropických oblastech Afriky, Asie a Evropy. Do tohoto podrodu patří nejméně 10 popsaných druhů.

Phlebotomus papatasi s podobným rozšířením jako *P. sergenti* zasahuje v Evropě i do severnějších oblastí a je jedním z nejběžnějších druhů nacházených v okolí lidských sídlišť i v samotných domácnostech. *P. papatasi* má poměrně velkou ekologickou plasticitu a nachází se ve velmi rozmanitých biotopech. Je antropofilní, ale kutánní leishmanióza (*Le. major*), kterou přenáší, je typickou zoonózou. Mimoto přenáší i další onemocnění, způsobené např. fleboviry (Killick-Kendrick, 1990, Guernaoui, 2009), jako je horečka papatači a jiné.

2.5.2 *Sergentomyia*

Rod *Sergentomyia* stejně jako rod *Phlebotomus* žije ve Starém světě, ale odlišuje se hlavně výběrem hostitelů a preferuje plazy. Důležitým taxonomickým znakem jsou přilehlé štětiny na tergitech, u rodu *Phlebotomus* tyto štětiny odstávají od těla (Lane et al., 1993).

Sergentomyia schwetzi žije převážně v subsaharské Africe v různých biotopech a je zde běžným druhem. Je vektorem plazích leishmanií, které nejsou patogenní pro člověka, přičemž se plazi nakazí spíše pozřením sergentomyie než při jejím sání. Tento druh je však částečně mamaliofilní, a proto se uvažovalo i o možném zapojení do přenosu lidských leishmanií (Lainson et al., 1987, Mutinga et al., 1994). Nicméně tato možnost byla nedávno vyvrácena (Sadlova et al., 2013).

2.5.3 *Lutzomyia*

Lutzomyia se odlišuje od rodu *Phlebotomus* svým výskytem, a to v Novém světě.

Lutzomyia longipalpis je hojným a poměrně rozšířeným druhem v Jižní Americe, zejména v městech a vesnicích, kde se vyskytují hospodářská zvířata. *L. longipalpis* je převážně asociována s přenosem viscerální leishmaniózy (*Le. infantum*, v Americe označované *Le. chagasi*) a ačkoliv je vázaná na obydlené oblasti, vyskytuje se zde jako zoonóza. Existuje stále více důkazů, že tento druh představuje komplex druhů. (Cunha, 1995, Uribe, 1999).

3. MATERIÁL A METODIKA

3. 1 Použité druhy flebotomů

K pokusům byli použiti samci rodů *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Lutzomyia*. U rodu *Sergentomyia* a *Lutzomyia* byl vybrán vždy jeden zástupce, u rodu *Phlebotomus* jeden nebo více zástupců pěti podrodů. Většina vybraných druhů má velký medicínský význam.

Tab. 3-1: Vybrané druhy flebotomů, u jejichž samců byla měřena doba rotace vnějších genitálií.

rod	podrod	druh
<i>Phlebotomus</i>	<i>Adlerius</i>	<i>P. arabicus</i>
	<i>Larroussius</i>	<i>P. orientalis</i>
		<i>P. tobbi</i>
	<i>Euphlebotomus</i>	<i>P. argentipes</i>
	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. sergenti</i>
	<i>Phlebotomus</i>	<i>P. papatasi</i>
<i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia</i>	<i>S. schwetzi</i>
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>L. longipalpis</i>

3.2 Chov flebotomů

Kolonie flebotomů jsou chovány ve stabilních podmínkách při teplotě 25 – 26 °C, vzdušné vlhkosti okolo 70 % a fotoperiodou 14 hodin světla. Larvy, které jsou umístěny v kelímcích s vnitřním povrchem ze sádry, jsou uchovávány v rozmanitějších podmínkách podle preferencí a původu jednotlivého druhu: teplota v rozmezí 25 – 28 °C, vzdušná vlhkost až 90 % (Volf et al., 2011).

Vylíhnutí dospělci jsou vypouštěni do sítí z monofilové příze zavěšených na kovových konstrukcích a jako zdroj potravy mají k dispozici roztok sacharózy, samicím je umožněno jednou až dvakrát týdně sát krev (převážně na myších, křečcích nebo králících).

Přibližně za 5 dní od nasátí se samice umísťují do kelímků se sádrou, aby zde mohly naklást vejce. Kelímky jsou uchovávány v dózách s pískem ve vhodné teplotě a vzdušné vlhkosti. Po 7 – 10 dnech se z vajec líhnou larvy prvního instaru (L1) a ty jsou živeny směsí králíčího trusu a pelet (směs prošla procesem fermentace, sušení a mletí). Larvy dále

prochází dalšími instary (L2, L3, L4) a jsou pravidelně kontrolovány a krmeny. Larvální vývoj trvá okolo 30-ti dnů, následuje stádium kukly trvající asi 10 dní. Některé druhy flebotomů mají větší variabilitu v délce trvání jednotlivých stádií a to je někdy navíc ještě komplikováno obdobími diapauzy larev (u druhů z monzunových oblastí nebo např. savan). Celkový vývoj trvá asi 45– 60 dní.

3.3 Měření rotace vnějších genitálií samců flebotomů

K pokusům byli použiti pouze samci, přičemž bylo potřeba držet každého jedince odděleně, aby nedošlo k záměně a bylo možné přesně zachytit důležité momenty vývoje. Proto bylo v každém samostatném experimentu vždy 50 kukel jednotlivě vloženo do skleněných lékovek (o rozměrech: 56 mm výška, 25 mm šířka) se složeným filtračním papírem a uzavřené prodyšným uzávěrem s monofilem. Manipulace s kuklami je citlivá záležitost, i drobné poškození kukly může vést k jejímu úhynu. Proto musí být uchopení kukly pinzetou velmi jemné.

Aby se minimalizovala doba pobytu kukel v lékovkách, byly vybírány až v pozdním stádiu vývoje, přibližně 8 dní staré, což lze poznat podle černého zabarvení těla a až stříbřitého zabarvení základů křídel. Mladší kukly by nebylo vhodné používat, protože by mohlo při manipulaci dojít k ovlivnění nebo zastavení jejich vývoje. Aby se zajistil co největší zastoupení samců vylíhnutých z kukel, byly vybírány kukly podle šířky a zahnutí abdomenu. Samci by měli mít konec těla více prohnutý a užší. Bohužel toto pravidlo neplatí vždy a je více přechodných variací. Mnohem spolehlivější bylo vybírat kukly z kelímků, kde ještě nedocházelo k líhnutí dospělců a přitom kukly již byly v poslední fázi vývoje (samci se líhnou dříve než samice). Případné vylíhnuté samice byly vráceny zpět do kolonie.

Lékovky byly umístěny do plastového boxu s navlhčeným filtračním papírem a tato vlhkost byla udržována po celou dobu pozorování, taktéž i teplota. Kukly byly kontrolovány pod lupou v průběhu celých 24 hodin v intervalu jedné hodiny ve dne, v noci v intervalu dvou hodin. Na celý cyklus všech jedinců bylo potřeba mít vyhrazeno až 90 hodin, aby nedošlo k přerušení sledování.

3.4 Schéma pokusů

3.4.1 Srovnání doby trvání a začátku rotace u jednotlivých zástupců podrodů

U všech sledovaných druhů (viz tabulka 3-2) byla měřena a srovnávána doba začátku rotace (čas od vylíhnutí až po začátek rotování) a doba, po kterou rotace probíhala (od začátku rotování po konečné dorotování) včetně jednotlivých dílčích fází.

U všech pokusů se všemi studovanými druhy byly dodržovány stejné podmínky: teplota 25 °C a vzdušná vlhkost 60 – 70 %, stejné místo kde probíhalo sledování i stejné intervaly kontrol.

Tab. 3-2: Celkové počty použitých kukel u jednotlivých druhů

podrod	zvolený druh	počet použitých kukel	počet plně dorotovaných samců
<i>Adlerius</i>	<i>P. arabicus</i>	100	48
<i>Larroussius</i>	<i>P. orientalis</i>	150	73
	<i>P. tobbi</i>	150	54
<i>Euphlebotomus</i>	<i>P. argentipes</i>	100	56
<i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. sergenti</i>	100	53
<i>Phlebotomus</i>	<i>P. papatasi</i>	90	59
	<i>P. papatasi</i> (20 °C)	60	43
<i>Sergentomyia</i>	<i>S. schwetzi</i>	90	40
<i>Lutzomyia</i>	<i>L. longipalpis</i>	100	52

3.4.2 Srovnání doby rotace v rámci podrodu

U podrodu *Larroussius* byly vybrány 2 druhy: *P. orientalis* a *P. tobbi* u kterých byla srovnávána doba rotace. Postup byl zachován stejně jako v předchozích pokusech.

3.4.3 Závislost rotace na denní době líhnutí

U všech výše zmíněných druhů bylo také zjišťováno, jestli je doba rotace genitálií ovlivněna denní dobou, ve které se samci vylíhnuli.

3.4.4 Závislost doby rotace na teplotě

U vybraného druhu *P. papatasi* byl zjišťován vliv okolní teploty na dobu rotace genitálií. Byly zvoleny teploty na okrajích optima pro vývoj larev a jejich líhnutí, tedy 20 a 25 °C a tyto byly dodržovány po celou dobu pokusu. 90 kukel bylo použito pro pokus při 25 °C, 60 kukel při 20 °C. Postup byl zachován stejný jako v předchozích pokusech

3.5 Vyhodnocení

U každého studovaného druhu flebotoma byly provedeny dvě, někdy i tři série opakování. Do protokolu byla zaznamenávána každá kontrola a stav kukel a později dospělců. Nejdůležitějšími momenty byl čas vylíhnutí, začátku rotování genitálií, otočení o 90 ° a otočení o 180 °, tedy ukončení rotování.

Pro vyhodnocení byly použity pouze údaje samců, u kterých byly známy všechny údaje (hlavně čas vylíhnutí, začátku rotace a úplné dorotování). Tyto časy byly zpracovány v tabulkách a grafech. Každý experiment byl opakován nejméně dvakrát a výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem ANOVA v programu Statistica. Hladina pravděpodobnosti byla zvolena 95% ($p = 0,05$).

4. VÝSLEDKY

4.1 Srovnání doby trvání a začátku rotace u jednotlivých zástupců podrodů

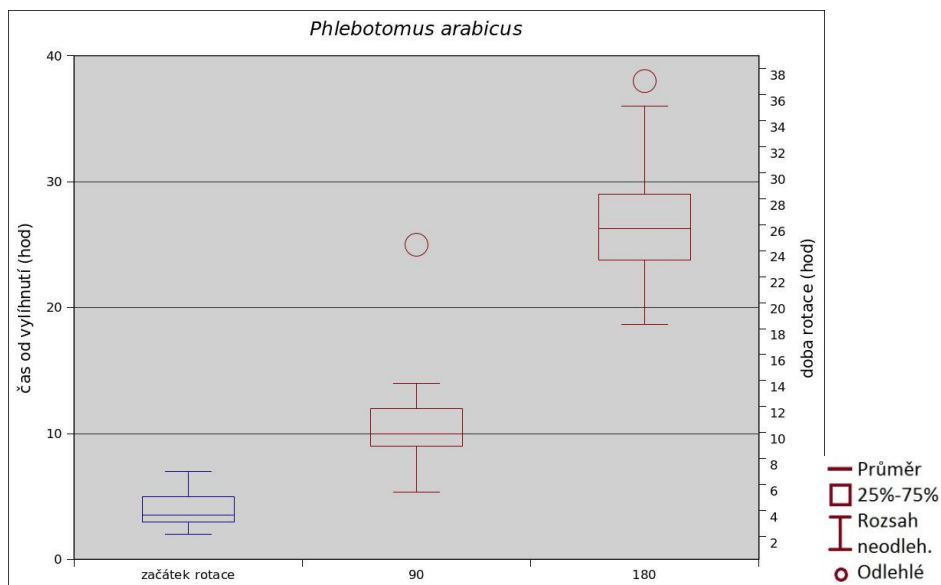
U vybraných zástupců podrodů rodu *Phlebotomus*, jednoho druhu rodu *Sergentomyia* a jednoho druhu rodu *Lutzomyia* byla měřena doba trvání rotace samčích genitálií a doba, za kterou od vylíhnutí rotace započala. Po každou hodinu ve dne a po dvou hodinách v noci byl každý jedinec opakovaně kontrolován a jeho stav zaznamenán do protokolu. Byly zahrnuty údaje jen od těch samců, u kterých byla zaznamenána všechna data. Některé kukly se vůbec nevylíhly, někteří samci měli problémy se svléknutím kukly (kukla zůstala přichycená na genitáliích nebo nohách a takovýto jedinec nemohl být zahrnut do měření) nebo krátce po vylíhnutí uhynul.

Výsledné časy jsou zaznamenány v následujících tabulkách a grafech.

V grafu jsou vždy znázorněny tři boxy: první zobrazuje dobu od vylíhnutí po začátek rotace (měřítko vlevo), druhý zobrazuje dobu od začátku rotace po otočení o 90 ° a třetí zobrazuje dobu od začátku rotace po úplné dorotování do 180 ° (pro oba platí měřítko napravo).

Phlebotomus arabicus

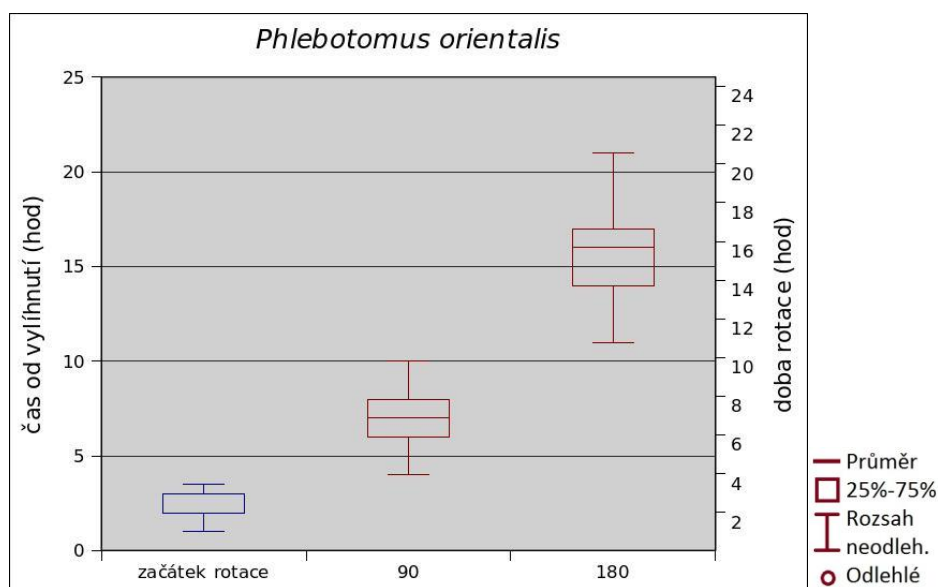
Průměrná doba rotace u druhu *P. arabicus* byla 26 hodin (medián 26 hodin), ale s výrazně vysokou směrodatnou odchylkou $sd = 4,6$ která byla nejvyšší ze všech měřených druhů. Nejkratší doba rotace byla 19 hodin a nejdelší trvala 38 hodin. Byl zde ale zaznamenán poměrně velký počet kukel, které se nevylíhly (až 30 %), což podporuje dosavadní znalosti o vysoké citlivosti tohoto druhu.



Obr. 4-1: Doba rotace vnějších genitálií u *Phlebotomus arabicus* (Adlerius) (n = 48).

Phlebotomus orientalis

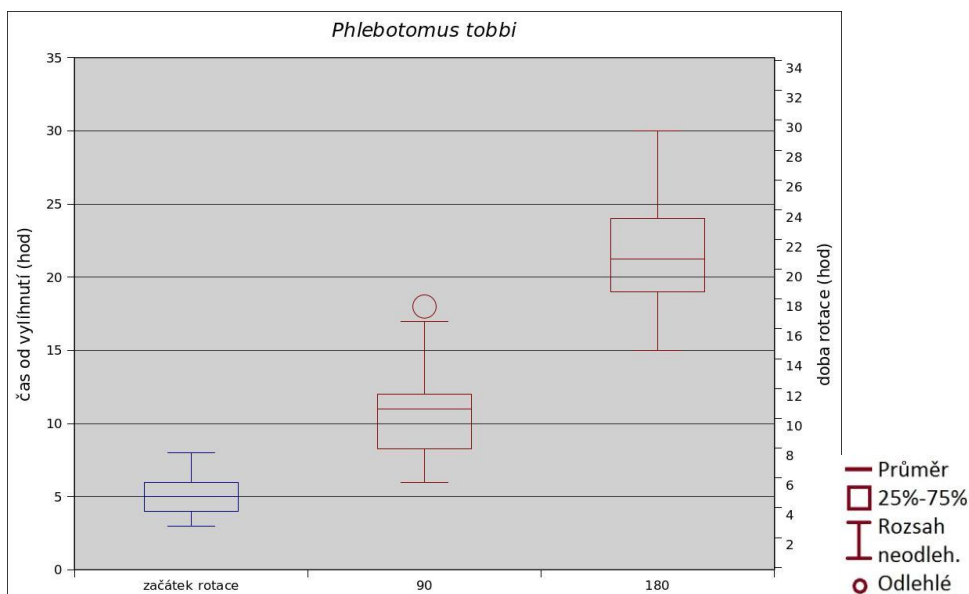
Rotace u *P. orientalis* průměrně trvala 16 hodin (medián 16 hodin) a řadíme ho mezi druhy s kratší dobou rotace. Nejkratší zaznamenaná doba rotace byla 11 a nejvyšší 21 hodin a se směrodatnou odchylkou $sd = 2,7$ nevykazoval žádné extrémní hodnoty. *P. orientalis* začíná rotovat po 2 hodinách po vylíhnutí a tato doba byla téměř shodná u všech měřených jedinců. Úspěšnost plného dorotování, líhnutí i přežívání byla velmi dobrá, viz tabulka Tab. 4-3.



Obr. 4-2: Doba rotace vnějších genitálií u *Phlebotomus orientalis* (Larrousius) (n = 73).

Phlebotomus tobbi

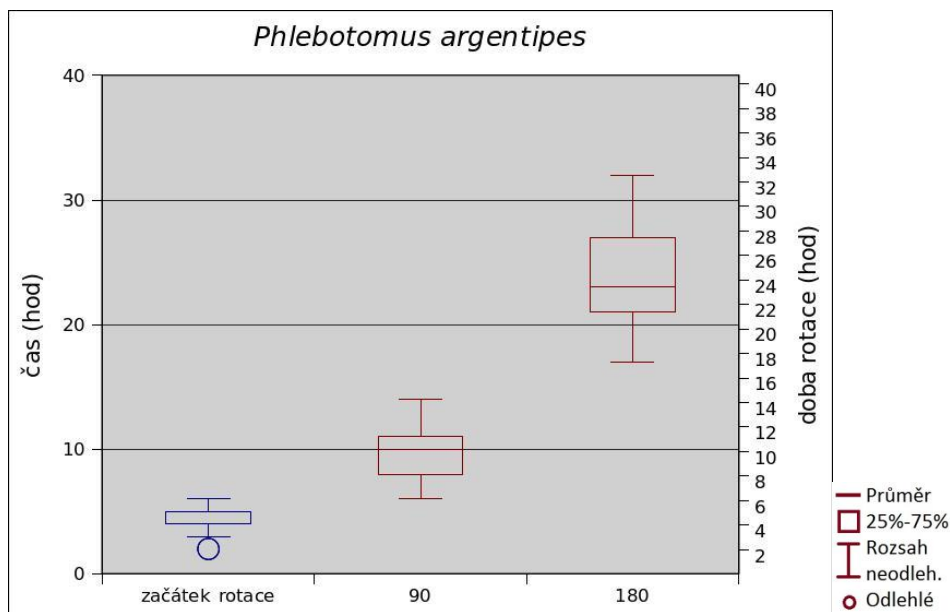
P. tobbi průměrnou dobou rotace 22 hodin (medián 21 hodin) a rozmezím hodnot 15 až 30 hodin se neřadí k druhům s extrémními dobami rotace. Směrodatná odchylka $sd = 3,2$ poukazuje spíše na menší rozptyl ve srovnání s ostatními druhy. *P. tobbi* začíná rotovat průměrně po 5 hodinách od vylíhnutí, tedy poměrně pozdě. Tento velmi citlivý druh měl ale nejnížší podíl úspěšně dorotovaných samců, viz tabulka Tab. 4-3.



Obr. 4-3: Doba rotace vnějších genitálií u *Phlebotomus tobbi* (Larroussius) (n = 54).

Phlebotomus argentipes

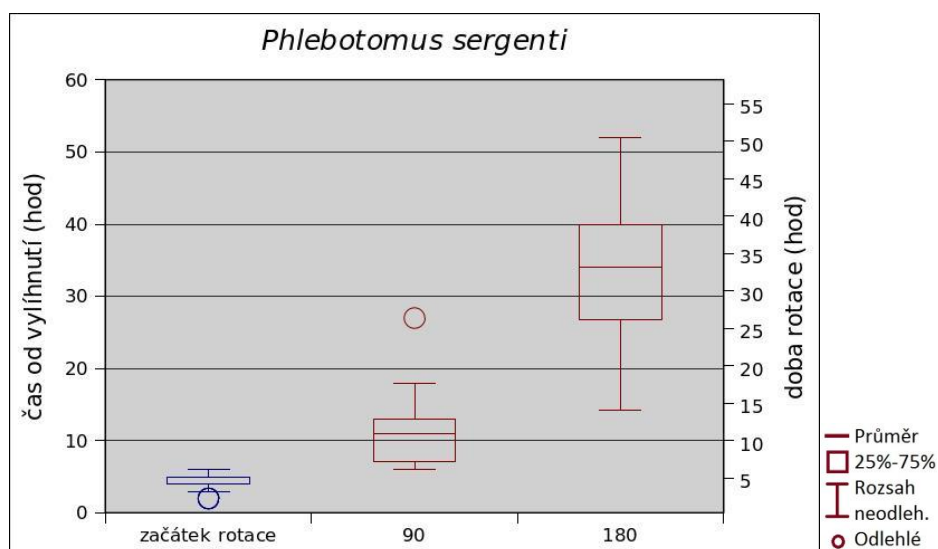
Průměrná doba rotace u *P. argentipes* trvala 23 hodin (medián 24 hodin), přičemž nejnížší naměřená hodnota byla 17 hodin a nejvyšší 32 hodin. Směrodatná odchylka $sd = 4,2$ řadí *P. argentipes* k flebotomům s vyšším rozptylem doby rotace. *P. argentipes* začíná rotovat průměrně po 4 hodinách od vylíhnutí. Tento druh patřil také k citlivějším druhům a až 25 % kulek se nevyvíjelo.



Obr. 4-4: Doba rotace vnějších genitálií u *Phlebotomus argentipes* (*Euphlebotomus*) (n = 56).

Phlebotomus sergenti

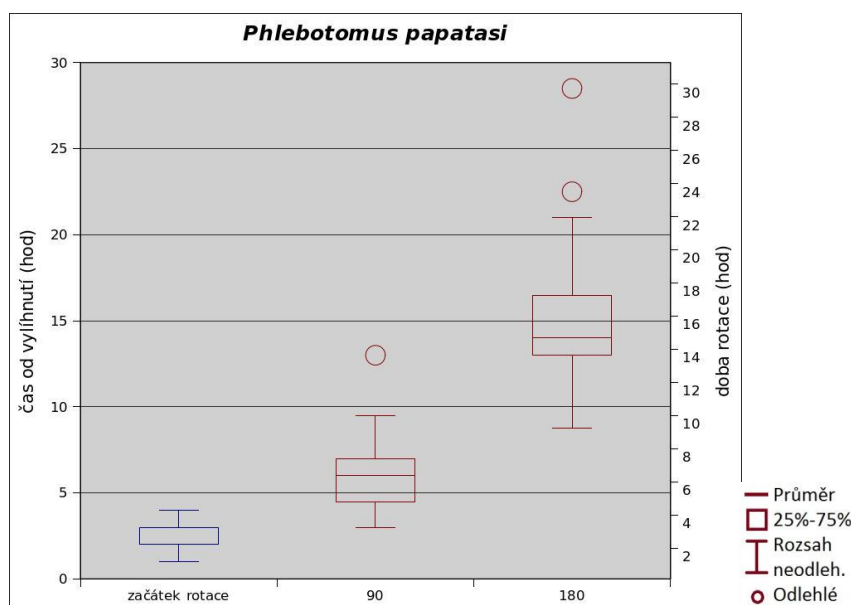
U druhu *P. sergenti* se ukázala velká variabilita v době rotace genitálií, v rozsahu od 14 hodin do 52 hodin, což byl nejenom největší rozsah hodnot (směrodatná odchylka $sd = 9,3$), ale i nejdelší celková doba tohoto procesu v porovnání s ostatními zkoumanými druhy. Tento trend se objevoval u všech opakování pokusu. *P. sergenti* začíná rotovat průměrně po 3 hodinách od vylíhnutí.



Obr. 4-5: Doba rotace vnějších genitálií u *Phlebotomus sergenti* (*Paraphlebotomus*) (n = 53).

Phlebotomus papatasi

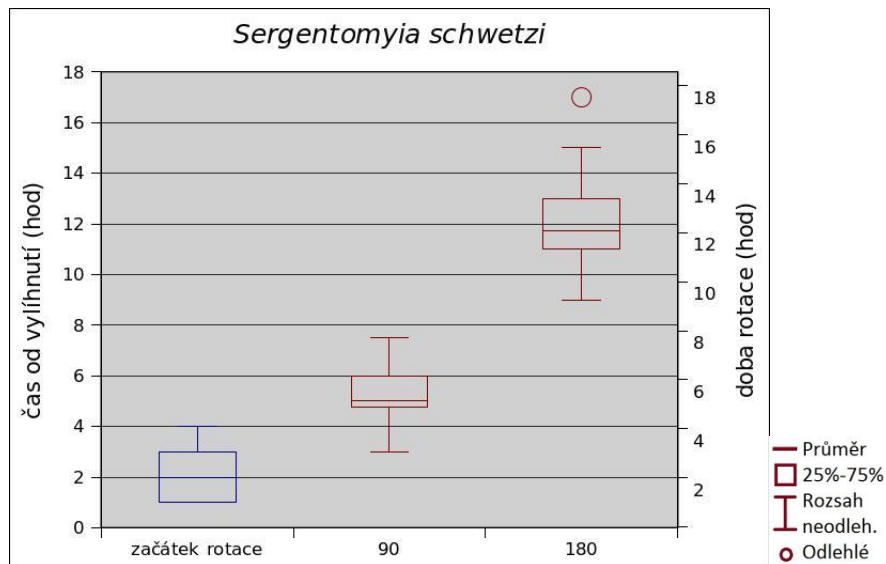
P. papatasi byl velmi dobře hodnotitelným druhem pro svou relativně nízkou citlivost na manipulaci a vysokou úspěšnost plného dorotování. S nejnižší naměřenou hodnotou 9 hodin je druhem (společně s *S. schwetzi*) s nejkratší dobou rotace u všech zkoumaných druhů. Nejvyšší hodnoty dosahovaly 29 hodin a rozsahem hodnot doby rotace patří spíše k druhům s průměrným rozptylem ($sd = 3,4$). *P. papatasi* začíná rotovat průměrně po 2 hodinách od vylíhnutí.



Obr. 4-6: Doba rotace vnějších genitálií u *Phlebotomus papatasi* (*Phlebotomus*) ($n = 59$).

Sergentomyia schwetzi

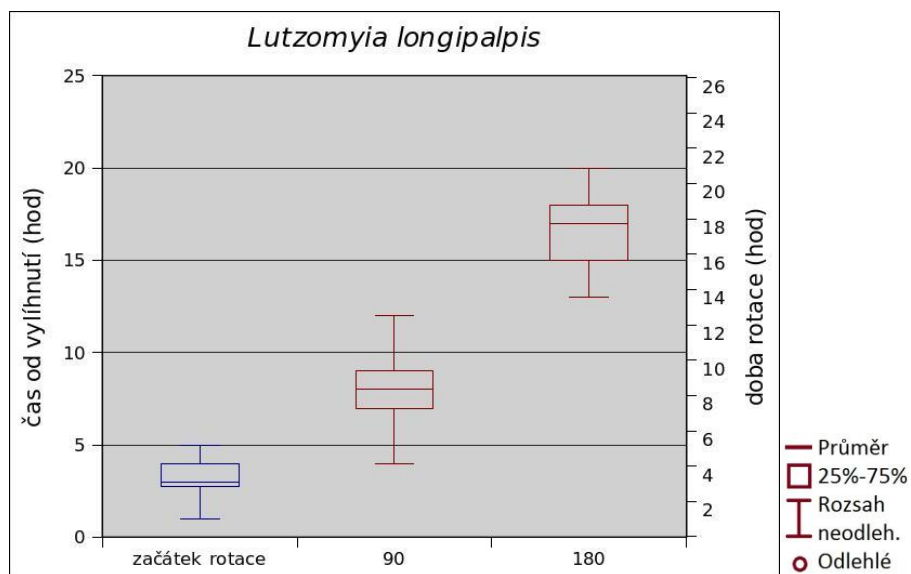
S. schwetzi s dobou rotace v rozmezí 9 až 17 hodin byl jednoznačně druhem s nejkratší dobou rotace oproti všem ostatním studovaným druhům. Průměrná doba byla tedy 11 hodin (medián 11 hodin) a rozptyl hodnot byl také nejnižším ze všech druhů ($sd = 1,5$). Průměrný začátek rotace byl 2 hodiny po vylíhnutí.



Obr. 4-7: Doba rotace vnějších genitálií u *Sergentomyia schwetzi* (n = 40).

Lutzomyia longipalpis

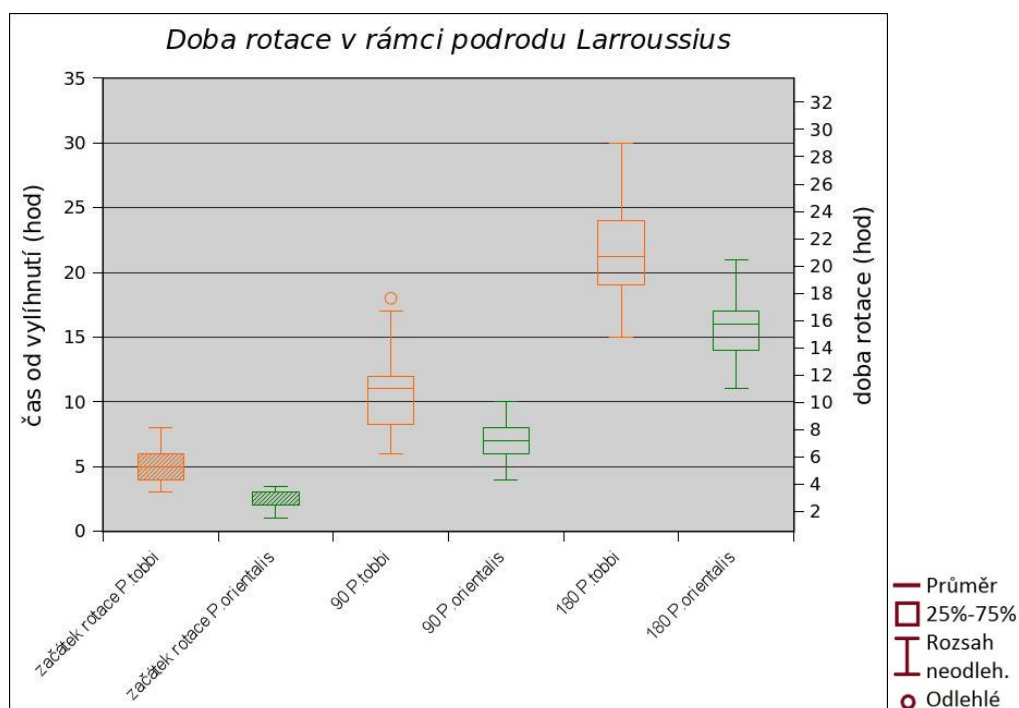
L. longipalpis patří též k druhům s rychlejším průběhem rotace, průměrně dorotují za 17 hodin (medián 17 hodin). Nejnížší naměřenou hodnotou bylo 13 hodin a nejvyšší 20 hodin, tedy s poměrně nízkým rozptylem hodnot (sd = 2,0). Rotace začíná průměrně po 3 hodinách po vylíhnutí.



Obr. 4-8: Doba rotace vnějších genitálií u *Lutzomyia longipalpis* (n = 52).

4.2 Srovnání doby rotace v rámci podrodu

V rámci podrodu *Larroussius* byly vybrány druhy *P. orientalis* a *P. tobbi*, u nichž byla zjišťována doba rotace vnějších genitálií. Průměrná doba rotace byla u obou druhů rozdílná, u *P. orientalis* 16 hodin (11 až 21 hodin), u *P. tobbi* 21 hodin (15 až 30 hodin). Výrazně se lišily též začátky rotací, u *P. orientalis* začínala po 2 hodinách a u *P. tobbi* po 5 hodinách od vylihnutí, což byla mimo jiné nejdelší naměřená hodnota začátku rotace u všech vybraných druhů. *P. tobbi* byl také nejcitlivějším druhem a bylo nutné vícečetné opakování experimentu kvůli vysoké úmrtnosti jedinců. Pouze nižší rozptyl hodnot byl jedinou veličinou spojující tyto dva druhy.



Obr. 4-9: Srovnání doby rotace rodu *Larroussius* u druhů *P. orientalis* a *P. tobbi*.

4.3 Závislost denní doby líhnutí na době rotace

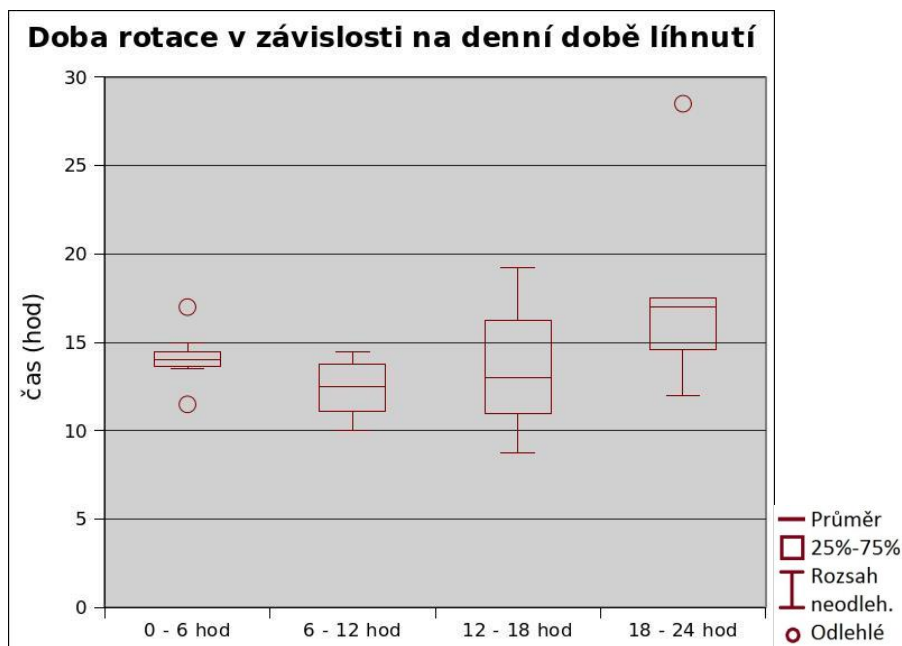
U všech výše zmíněných druhů bylo testováno, zda denní doba, ve které se jedinec vylíhne z kukly, ovlivňuje dobu rotace. Vliv denní doby by mohl totiž znamenat vliv teploty, fotoperiody nebo jiného faktoru, přestože většina míst vývoje larev flebotomů a následného líhnutí a odpočívání vykazuje velice stabilní a neměnné podmínky.

Během 24 hodinového cyklu byla srovnávána doba trvání rotace v intervalech po šesti hodinách. Jako příklad je zde uveden druh *P. papatasi*. Doba rotace se významně nelišila u jedinců vylíhnutých v různých částech dne (ANOVA $F(16, 13) = 1,4375$, $p = 0,25745$), ale s rostoucí denní dobou líhnutí se u *P. papatasi* zvětšoval rozptyl hodnot, což se u ostatních druhů neprojevovalo. Proto se nejspíše jedná o náhodný jev, který je zde uveden jako zajímavost.

Doba rotace u každého druhu byla různě dlouhá a v různých rozptylech, ale ani u jednoho druhu se neprojevila závislost na denní době líhnutí: *P. arabicus* (ANOVA $F(19, 10) = 0,28668$, $p = 0,99075$), *P. orientalis* (ANOVA $F(18, 11) = 1,8897$, $p = 0,14126$), *P. tobbi* (ANOVA $F(15, 11) = 1,0299$, $p = 0,49111$), *P. argentipes* (ANOVA $F(17, 10) = 4,7753$, $p = 0,09791$), *P. sergenti* (ANOVA $F(16, 17) = 0,62424$, $p = 0,82402$), *S. schwetzi* (ANOVA $F(16, 3) = 0,96722$, $p = 0,59588$) a *L. longipalpis* (ANOVA $F(18, 10) = 1,6284$, $p = 0,21720$).

Tab. 4-1: Doba rotace jedinců *P. papatasi* vylíhnutých v jednotlivých denních etapách.

Denní doba	Doba rotace			Směrodatná odchylka
	Průměr	Nejnižší	Nejvyšší	
0-6 hod.	14	12	17	2
6-12 hod.	13	10	15	2
12-18 hod.	14	9	19	4
18-24 hod.	15	12	29	7



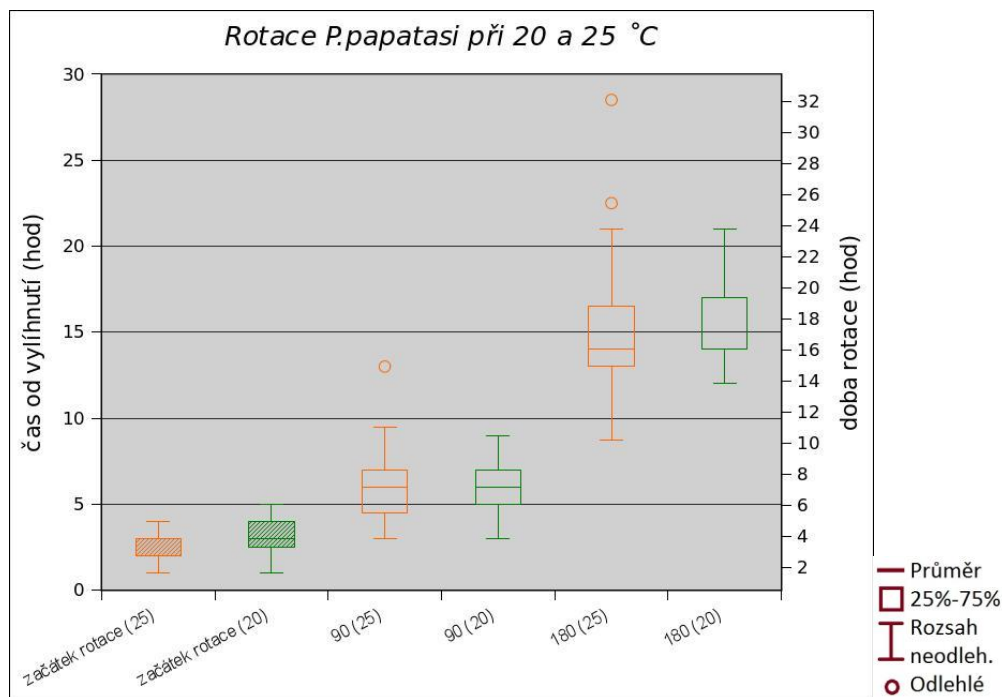
Obr. 4-10: Doba rotace jedinců *P. papatasi* vylíhnutých v jednotlivých denních etapách.

4.4 Závislost doby rotace na teplotě

U druhu *P. papatasi* byla měřena doba rotace u dvou rozdílných teplot: 20 a 25 °C. Tyto teploty byly takto určeny, protože jsou na okrajích teplotního optima a korespondují s přirozenými podmínkami.

Významný rozdíl v rotaci při těchto teplotách se neprojevil jak při celkové době rotace (ANOVA $F(1, 95) = 0,30177$, $p = 0,58407$), tak při rotování do 90 ° (ANOVA $F(1, 95) = 0,47299$, $p = 0,49329$), signifikantní rozdíl byl shledán pouze v době od vylíhnutí po začátek rotace (ANOVA $F(1, 95) = 20,597$, $p = 0,00002$). Rozdíly se projeví hlavně v rozptýlu hodnot, u skupiny chované a vylíhnuté při 20 °C byly hodnoty v rozmezí 12 až 21 hodin, při 25 °C 9 až 29 hodin.

Závislost průběhu rotace na teplotě se nijak významně neprojevila, při vyšší teplotě sice byl vyšší rozptyl hodnot, ale ukazoval se spíše jen jako extrémní hodnoty.



Obr. 4-11: Doba rotace u druhu *P. papatasi* při 20 °C (n = 59) a 25 °C (n = 43).

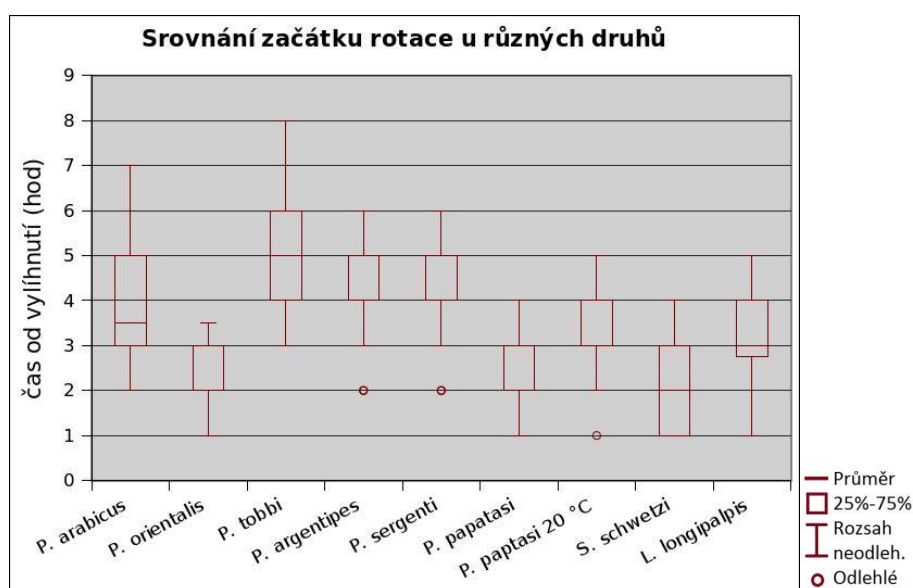
V následující tabulce jsou shrnuty doby celkové rotace, dorotování do 90 ° a začátky rotace od vylihnutí u všech zkoumaných druhů.

Tab. 4-2: Jednotlivé fáze rotace u vybraných druhů flebotomů.

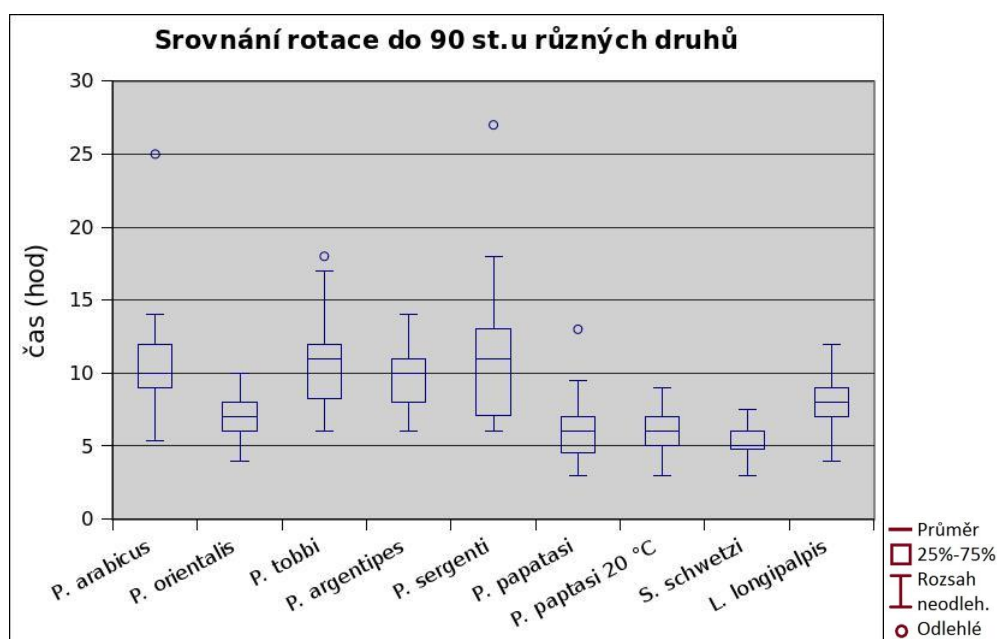
		<i>P. arabicus</i>	<i>P. orientalis</i>	<i>P. tobbi</i>	<i>P. argentipes</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>P. papatasi</i>	<i>P. papatasi</i> (20 °C)	<i>S. schwetzi</i>	<i>L. longipalpis</i>
začátek rotace	průměr (v hod.)	3,8	2,3	4,9	4,3	4,3	2,4	3,2	2,2	3,1
	medián (v hod.)	3,5	2	5	4	4	2	3	2	3
	rozptyl	1,3	0,5	2,6	1,1	1,3	0,7	0,9	0,8	0,9
	směrodatná odchylka	1,1	0,7	1,6	1,1	1,2	0,8	0,9	0,8	0,9
rotace 90°	průměr (v hod.)	10,6	7	10,6	9,9	10,7	6	5,7	5,2	8,4
	medián (v hod.)	10	7	11	10	11	6	6	5	8
	rozptyl	7,8	2,2	8	5,3	15,2	3,9	1,8	1,4	2,7
	směrodatná odchylka	2,8	1,5	2,8	2,3	3,9	1,9	1,3	1,2	1,7
rotace 180°	průměr (v hod.)	26,6	15,6	21,8	24	32,9	14,9	15,2	12	16,7
	medián (v hod.)	26,3	16	21,3	23	34	14	14	11,8	17
	rozptyl	20,9	7,5	10,1	17,5	86,7	11,5	5,1	2,6	4,1
	směrodatná odchylka	4,6	2,7	3,2	4,2	9,3	3,4	2,3	1,6	2

Tab. 4-3: Shrnutí úspěšnosti líhnutí a dorotování samců u jednotlivých druhů.

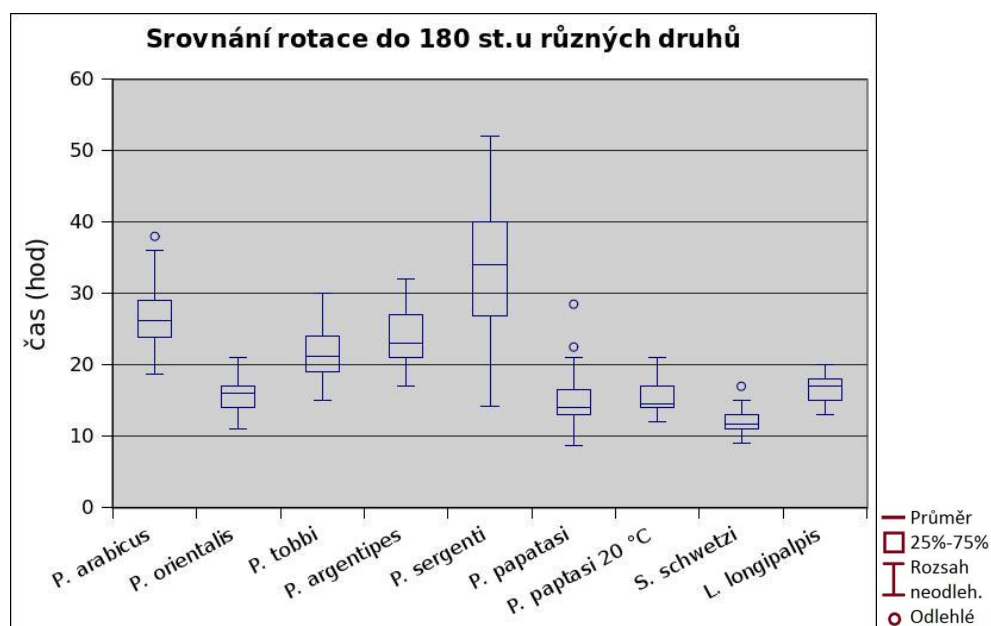
	<i>P. arabicus</i>	<i>P. orientalis</i>	<i>P. tobbi</i>	<i>P. argentipes</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>P. papatasi</i>	<i>P. papatasi</i> (20 °C)	<i>S. schwetzi</i>	<i>L. longipalpis</i>
celkový počet použitých kulek	100	150	150	100	100	90	60	90	100
počet nevylíhnutých kulek	35	31	57	24	29	16	11	26	16
počet vylíhnutých samic	12	36	17	17	13	12	4	12	27
počet vylíhnutých samců	53	83	76	59	58	62	45	52	57
počet plně dorotovaných samců	48	73	54	56	53	59	43	40	52
podíl plně dorotovaných samců z vylíhnutých samců (v %)	91	88	71	95	91	95	96	77	91
počet defektních samců	5	10	22	3	5	2	3	12	5
podíl defektních samců z vylíhnutých samců (v %)	9	12	29	5	9	3	7	23	9



Obr. 4-12: Srovnání doby od vylíhnutí po začátek rotace u jednotlivých druhů.



Obr. 4-13: Srovnání doby od začátku rotace po dorotování do 90° u jednotlivých druhů.



Obr. 4-14: Srovnání celkové doby rotace od začátku rotace u jednotlivých druhů.

Téma II.

5. LITERÁRNÍ PŘEHLED

5.1 Taxonomie flebotomů

Rod *Phlebotomus* je jedním ze dvou rodů flebotomů žijících ve Starém světě (*Phlebotomus* a *Sergentomyia*) a zahrnuje všechny vektory původců lidských leishmanióz vyskytujících se v této oblasti. Výskyt onemocnění v posledních desetiletích stoupá, a proto roste i zájem o výzkum přenašečů. Vznikají proto nové výzkumné programy, které se zabývají stále podrobnějším studiem flebotomů z pohledu morfologie, genetiky, ekologie a mnoha dalších.

Základem taxonomie i v dnešní době stále zůstává morfologie, která je ovšem podpořená moderními molekulárními metodami (Seblova et al., 2013). Co nejrozsáhlejší a nejpodrobnější znalosti o morfologii poskytují podklady nejenom pro taxonomii, ale i pro další aspekty výzkumu flebotomů.

Poprvé byli flebotomové popsáni na konci 17. století. Jméno *Phlebotomus* jim bylo dáno až v roce 1840 Rondani a Berté. Na počátku 20. století již byla známa jistá souvislost mezi kožním onemocněním (leishmaniózou) a flebotomy, a začaly být popisovány jednotlivé druhy. Od této doby počet popsáných druhů stále roste (Rispaill et al., 1998, Dedet, 2005).

Úspěšná klasifikace a determinace závisí na několika málo vlastnostech, které musí být objektivně měřitelné a mít jasně definované hodnoty. Taxonomie byla nejprve založena na jednotlivých morfologických vlastnostech a takto byly např. popsány a odlišeny rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia* na základě vztyčených nebo přilehlých abdominálních chlupů (Newstead, 1911). Později byly klasifikovány jednotlivé podrody, a to na základě struktury samčích genitálií (Franca et al., 1921) jako je ochlupení coxitu a styletu, poměrné velikosti coxitu, styletu a aedeagu apod., u samic pak na základě stavby cibaria, faryngu a spermatéky (Adler et al., 1926), u obou pohlaví také na základě poměrů velikostí žilek na křídle.

Vytvoření těchto taxonů vzniklo na základě podobností znaků a všechny tyto znaky mají stejnou hodnotu, žádný z nich tedy není upřednostňován (fenetická klasifikace). Modernější verzí této metody je numerická taxonomie (kvantitativní fenetika), kde měřením a srovnáváním hodnot určitého znaku lze vytvářet podklady pro vytvoření evolučních

hypotéz a může zachytit i některé evoluční trendy u nepříbuzných druhů (Chavez et al., 1999). Aby tyto informace byly relevantní, musí být podloženy genetickými analýzami jako např. izoenzymová analýza nebo jinými metodami prokazujícími genetickou strukturu populací (Nei, 1987).

Většina taxonomických klíčů je založena na morfologických znacích, a tak stále zůstávají nejasnosti v systematickém zařazení a fylogenezi některých taxonů.

Tato práce zabývá taxonomickými znaky u *P. arabicus* (*Adlerius*). Podrod *Adlerius* je systematicky a taxonomicky velmi složitý. Vzhledem k tomu, že není častým přenašečem leishmanií tak se mu věnuje menší pozornost, a o to větší nejistota panuje v jeho taxonomii. Na rozdíl od jiných podrodů u podrodu *Adlerius* je založena většina determinačních znaků uváděných v klíčích na velikostních charakteristikách pohlavních znaků samců, nebo na počtu chlupů v políčku na coxitu. Tyto znaky však mohou být snadno ovlivněny celkovou velikostí těla nebo vnějšími podmínkami. Právě proto jsme se rozhodli na jednom druhu otestovat vliv některých vnějších vlivů na stálost determinačních znaků.

5.2 Geometrická morfometrie

V dnešní době, ve které vzrůstá počet molekulárních metod (viz např. Dvorak et al., 2013), morfologie stále hraje v taxonomii důležitou roli. K tomu též přispívá i rozvoj matematických a statistických metod, které umožňují získávání různých matematických modelů a analýz tvaru.

Jednou z metod měření velikostí a tvaru různých částí organismu je geometrická morfometrie. Geometrická morfometrie je statistická analýza tvaru a dalších veličin (Bookstein et al., 1991), která tak kvantifikuje klasickou metodu založenou na analýze tvaru landmarků, tedy několika daných bodů určitého objektu definovaného souřadnicemi a dalšími veličinami (zde např. křídlo flebotoma a žilky na křídle). U analýzy landmarků je ale popisován fenomén tzv. Prokrustova paradigma, které je vlastně určitou konfigurací některých bodů, které vedou k optimalizaci a unifikaci tvaru (Rohlf et al., 2013).

Výhodou geometrické morfometrie je hlavně detekce různých deformací a odlišností tvaru a takovéto údaje jsou velmi důležité z hlediska pochopení ekologických vztahů, jak už vnitrodruhových nebo mezidruhových. Vnitrodruhové odlišnosti jsou zkoumány např. jako geografická variabilita velikosti těla nebo některých jeho částí, např. křídel (Chown et al., 2003). Dvorak et al. (2006) uvádí křídla jako nejvhodnější struktury pro geometricko-morfologické studie u hmyzu. Tato studie také poukazuje nejenom na značnou variabilitu velikosti křídla, ale i tvaru křídla druhu *P. sergenti* ze dvou různých lokalit, Izraele a Turecka. Tvar těla nebo jeho částí se tedy může lišit i v rámci jednoho druhu. Tvar těla je zároveň nejvíce nápadným aspektem fenotypu a poukazuje na současné působení genotypu a životního prostředí (Ricklews et al., 1994).

Rozdíly ve velikosti a tvaru se v rámci jednoho druhu mohou objevovat jak sympatricky, tak alopaticky. Sympatricky se ale tyto rozdíly projevují spíše u opačných pohlaví. Např. u *P. sergenti* z izraelské a turecké lokality se rozdíly ve velikosti křídla projevily jak mezi lokalitami, tak mezi pohlavími (Dvorak et al., 2006). Rozdíly mezi alopatickými populacemi jsou často ovlivněny geneticky (tj. různé geneticky odlišné populace).

5.3 Faktory ovlivňující vnitrodruhovou variabilitu

Velikost a tvar těla jsou podmíněny geneticky, často však korelují s abiotickými faktory, jako jsou nadmořská výška, geografická poloha nebo klima a neméně tak s biotickými faktory jako je distribuce hostitelů, larvální výživa, genetika a mnoho dalších.

Vliv genetiky

Geneticky podmíněná variabilita nejspíš hraje velkou roli, jak potvrzuje mnoho studií (Boussaa et al., 2008, Prudhomme et al., 2012, Khalid et al., 2012 atd.). Flebotomové jsou totiž špatnými letci nevzdalující se od svých lůhů nebo míst odpočinku na více jak několik set metrů (Killick - Kendrick et al., 1984). Oblasti, ve kterých se flebotomové vyskytují, jsou tak často relativně malé a jednotlivé populace můžou být vzájemně značně izolované.

Geneticky podmíněnou variabilitu lze očekávat nejenom u geograficky vzdálených oblastí, ale i mezi populacemi v jedné lokalitě, přičemž populace v těsné blízkosti si jsou geneticky podobnější než u vzdálených populací. Naopak u některých zdánlivě izolovaných populací *P. papatasi* v Egyptě se projevilo jisté propojení populací, a to vlivem lidské činnosti (dopravy) nebo vzdušnými proudy, které dokážou zanést flebotomy i na značné vzdálenosti (Schmidt et al., 1961). *P. papatasi* je navíc druhem, který dokáže létat na vzdálenosti až několika kilometrů (Khalid et al., 2012).

Larvální výživa

Larvální výživa je bezpochyby dalším faktorem s obrovským významem pro variabilitu dospělců, zejména jejich celkovou velikost. V některých studiích byla prokázána přímá souvislost mezi množstvím dostupné potravy během larválního vývoje a velikostí těla (Jirakanjanakit et al., 2007, Wermelinger et al., 2001). Větší množství potravy vedlo k větším rozměrům těla, což bylo ovlivněno i kompetencí jedinců. Čím více larev soutěžilo o potravu, tím byl tento efekt slabší.

Enviromentální vlivy

Další velmi výraznou strukturou, která také vykazuje variabilitu vlivem vnějších i vnitřních faktorů, jsou samčí pohlavní orgány. Jsou navíc dobře měřitelnou částí těla flebotomy a jsou druhově specifické. Pro zjišťování různých malformací se nejčastěji měří a porovnávají velikosti coxity a parameru a poloha chlupů na styletu a případně různé anomálie. Anomáliemi se rozumí chybějící nebo nadbytečné struktury, např. počet chlupů na coxite, styletu apod. Guernaoui et al. (2009) zkoumali příčiny malformací a anomálií u marockých populací *P. papatasi* a ukázaly se dva typy anomálií, symetrické a asymetrické. Asymetrické anomálie se průběžně vyskytovaly u většiny populací, ale symetrické anomálie silně korelovaly se znečištěným životním prostředím. Změny životního prostředí způsobené lidskou činností nejsou neočekávaným faktorem, je však poměrně obtížné odhadnout příčiny a důsledky.

Důsledkem vlivů různých faktorů mohou morfologické změny vést až ke změnám fyziologickým. Takovými změnami může být třeba vznik populace s jinou náchylností k infekci leishmaniemi a ovlivnění schopností přenosu. U druhu *P. argentipes* na Srí Lance bylo v ohnisku kutánní leishmaniózy nově zaznamenáno několik dalších a odlišných populací (Ranasinghe et al., 2012), což je důležitým poznatkem hlavně z epidemiologického hlediska. Více odlišných populací na jedné lokalitě tak zvyšuje komplexitu přenosu leishmaniózy a je tedy velmi důležité takové druhy dále studovat.

Klimatické a geografické vlivy

Na morfologických změnách dospělců se také pravděpodobně podílí klimatické podmínky, jako jsou teplota, vlhkost a nadmořská výška. Vliv nadmořské výšky lze nejspíš považovat pouze za komplexní působení teploty, vlhkosti, tlaku v kombinaci s distribucí hostitelů, kvalitou larválního vývoje a spoustou dalších možných faktorů. Teplota ovlivňuje v průběhu životního cyklu flebotomů více fází. Ovlivňuje rychlost vývoje vajec i larev (Guzman et al., 2000), což znamená, že může zkrátit nebo prodloužit tento vývoj a následkem toho můžou být i patrné změny ve velikosti těla. Tento faktor proto může být jistým způsobem propojen s efektem larvální výživy. Delší larvální stádium tak poskytuje delší dobu pro získání živin, což opět ovlivňuje velikost těla, vyšší teplota při larválním vývoji tedy souvisí s menší velikostí těla (Schneider et al., 2004). Právě vlivem teploty na velikost těla i jeho vybraných částí se věnuji v druhé části méj diplomové práce.

6. MATERIÁL A METODIKA

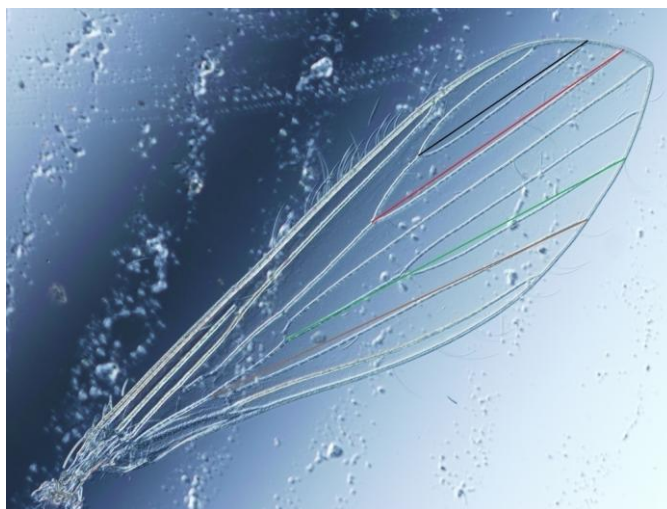
6.1 Chov flebotomů

K pokusům byli použiti samci druhu *Phlebotomus arabicus* původem z Izraele, kteří byli chováni v třech rozdílných teplotách 23, 25 a 28 °C, přičemž byli v těchto teplotách již od naklazení vajec, po celý larvální vývoj až po vylíhnutí v dospělé. Samice nasáté na myších byly po pěti dnech ve společné síti umístěny do kelímků vylitých sádrrou, které jsou určené pro kladení vajec. Tyto kelímky byly umístěny do termostatu s příslušnou teplotou. Všechny ostatní podmínky, jako vzdušná vlhkost, fotoperioda apod. byly u všech pokusů identické. Rovněž počet samic (20) umístěný do kelímku pro naklazení vajec byl v rámci různých experimentů srovnatelný, aby byl srovnatelný i počet larev v kelímcích držných v různých teplotách, a experiment tak nebyl ovlivněn odlišnou kompeticí larev o potravu. Larvy byly během vývoje krmeny směsí králíčího trusu a pelet 3x týdně (směs prošla procesem fermentace, sušení a mletí) a byl kontrolován stav jejich vývoje a podmínky, jako je např. vlhkost. Tento potup byl opakován až do doby vylétování prvních dospělců, kdy bylo krmení ukončeno. Vylíhnutí dospělí samci byli odchytáváni pravidelně 3x týdně, nebyli tedy nikdy starší než 4 dny. Poté byli usmrceni na ledu a přeneseni do zkumavky se 70% lihem. Po postupném nasbírání 50ti dospělých samců byl chov ukončen a experiment znovu zopakován stejným postupem s dalšími nasátými samicemi. Celkově bylo pro každou teplotu nasbíráno 100 samců (tj. dva nezávislé experimenty), kteří byli dále zpracováni do preparátů.

6.2 Měření velikosti křídel a znaků na pohlavních orgánech samců

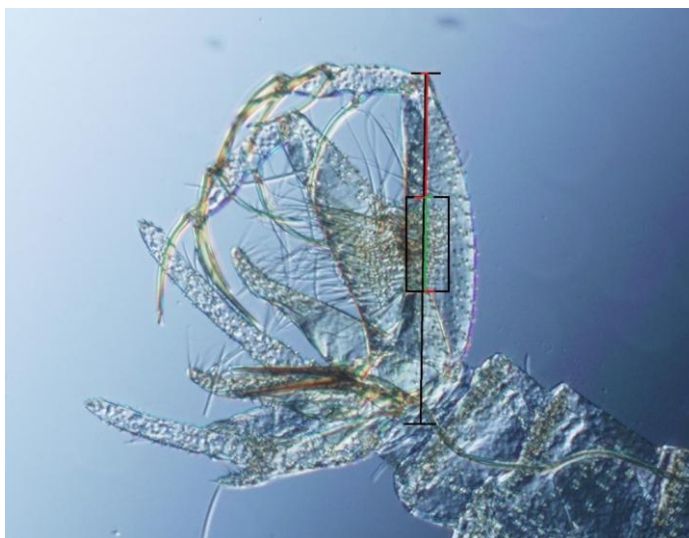
Velikost křídel i pohlavních orgánů ovlivňuje spousta vnějších i vnitřních faktorů. Jedním z důležitých faktorů ovlivňujících rychlost vývoje, tak i velikost těla je okolní teplota (Prudhomme et al., 2012). Samcům z jednotlivých teplot 23, 25 a 28 °C byly odstraněny křídla a terminální část zadečku s genitáliemi. Preparáty byly zality montovacím médiem DPX na podložním skle a přikryty krycím sklíčkem. U křídel bylo při zalévání nutné nechat křídlo rozvinout, aby bylo možné správně změřit žilky. U genitálií bylo důležité jemně přitlačit na krycí sklíčko, aby se jednotlivé části kopulačního aparátu pokud možno, co nejméně překrývaly. Preparáty byly ponechány při laboratorní teplotě 48 hodin pro úplné zaschnutí. Velikost a počet jednotlivých struktur byl měřen při zvětšení 40x pod mikroskopem Olympus BX51 se zabudovanou kamerou DP-70 v programu QuickPhotoMICRO.

Pro měření délky křídel byly zvoleny žilky na obou křídlech: R2 (černá), R4 (červená), RM-M2 (zelená) a M3 (hnědá) dle schématu v následujícím obrázku 7-2.



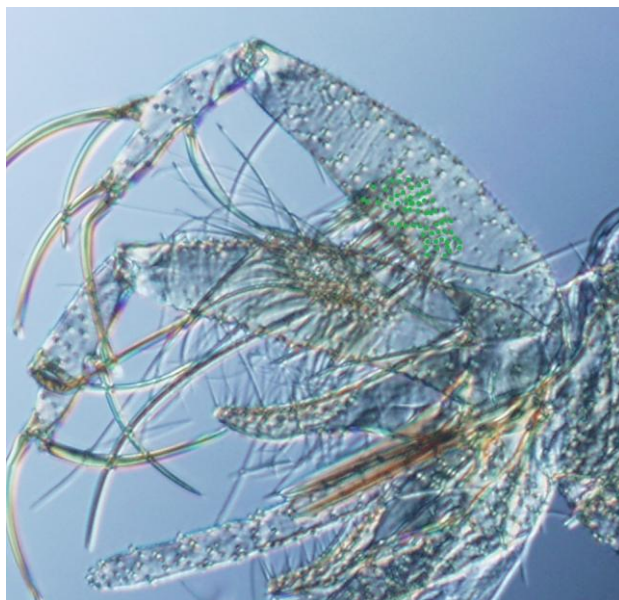
Obr. 6-1: Křídlo *P. arabicus* a měření délky žilek na křídle: R2 (černá), R4 (červená), RM-M2 (zelená) a M3 (hnědá).

U preparátů byly měřeny délka a šířka obou coxitů, velikost pole chlupů a vzdálenost pole chlupů od konce coxitu. Část preparátů byla špatně měřitelná a byl měřen pouze jeden z coxitů, dle schématu v následujícím obrázku 6-2.



Obr. 6-2: Samčí genitálie *P. arabicus* a měření délky coxitu (černá), délky pole chlupů (zelená) a vzdálenosti pole chlupů od konce coxitu (červená).

Byl také počítán počet chlupů v poli na coxitu (u preparátů s dobře natočeným coxitem, ne vždy je totiž dobře viditelná celá plocha pole chlupů), navíc toto měření bylo proveditelné vždy jen na jednom coxitu (pole chlupů na opačném coxitu není v preparátech dobře vidět).



Obr. 6-3: Schéma rozložení chlupů na coxitu u *P. arabicus* (zeleně).

7. VÝSLEDKY

Výsledky II. tematického okruhu této práce srovnávají vliv teploty na velikost daných tělních struktur, tedy křídel a genitálií u samců. V každé skupině bylo 100 samců, nicméně po zpracování a kontrole pod mikroskopem byli někteří samci vyřazeni z pokusů kvůli deformaci při zalití do preparátu a špatné měřitelnosti sledovaných struktur.

7.1 Srovnání velikosti křídel

Usmrceným samcům ze skupin chovaných při 23, 25 a 28 °C byla oddělena obě křídla a po zpracování a zamontování do preparátu byla změřena pod mikroskopem.

Délky žilek ukazují na signifikantní rozdíl mezi všemi teplotními skupinami, převážně mezi skupinou 23 °C a 25 °C (ANOVA žilka R2 - $F(4, 179) = 67,027$, $p = 0,000$), (ANOVA žilka R4 - $F(1, 182) = 59,223$, $p = 0,00000$), (ANOVA žilka RM-M2 - $F(1, 182) = 202,11$, $p = 0,0000$), (ANOVA žilka M3 - $F(1, 182) = 202,11$, $p = 0,0000$), kdy při nižší teplotě byly žilky (a tedy celé křídlo) delší. Rozdíl mezi skupinami 25 °C a 28 °C byl také statisticky významný (ANOVA žilka R2 - $F(4, 170) = 14,760$, $p = 0,00000$), (ANOVA žilka R4 - $F(2, 265) = 50,239$, $p = 0,0000$), (ANOVA žilka RM-M2 - $F(2, 265) = 161,22$, $p = 0,0000$), (ANOVA žilka M3 - $F(2, 265) = 84,476$, $p = 0,0000$), ale nebyl tak výrazný, jako mezi předchozími skupinami, žilky i celé křídlo při 28 °C bylo sice větší než při 25 °C, ale ne již s takovým rozdílem. Celkově byl významný rozdíl ve velikosti křídel mezi všemi skupinami 23, 25 a 28 °C (ANOVA žilka R2 - $F(2, 265) = 66,905$, $p = 0,00000$), (ANOVA žilka R4 - $F(2, 265) = 50,239$, $p = 0,0000$), (ANOVA žilka RM-M2 - $F(2, 265) = 161,22$, $p = 0,0000$), (ANOVA žilka M3 - $F(2, 265) = 84,476$, $p = 0,0000$).

Nebyl zaznamenán žádný rozdíl ve velikosti pravého a levého křídla při žádné z teplot (ANOVA 23 °C - $F(1, 90) = 0,00900$, $p = 0,92463$), (ANOVA 25 °C - $F(1, 118) = 0,30999$, $p = 0,57874$), (ANOVA 28 °C - $F(1, 118) = 0,30753$, $p = 0,58025$), až na několik málo jedinců, u kterých asymetrie nebyla nijak významná (rozdíl max. 1 %). Naměřené délky žilek také korelují s délkou larválního vývoje (doba od vylíhnutí prvních larev po vylíhnutí prvních dospělců), při teplotě 23 °C vývoj trval nejdéle a při 28 °C trval nejkratší dobu, přičemž byl opět největší rozdíl mezi 23 °C a 25 °C, mezi 25 °C a 28 °C nebyl rozdíl tak výrazný.

Tab. 7-1: Počet dní od vylíhnutí prvních larev po vylíhnutí prvních dospělců u jednotlivých teplot.

teplota	počet dní larválního vývoje
23 °C	33
25 °C	30
28 °C	28

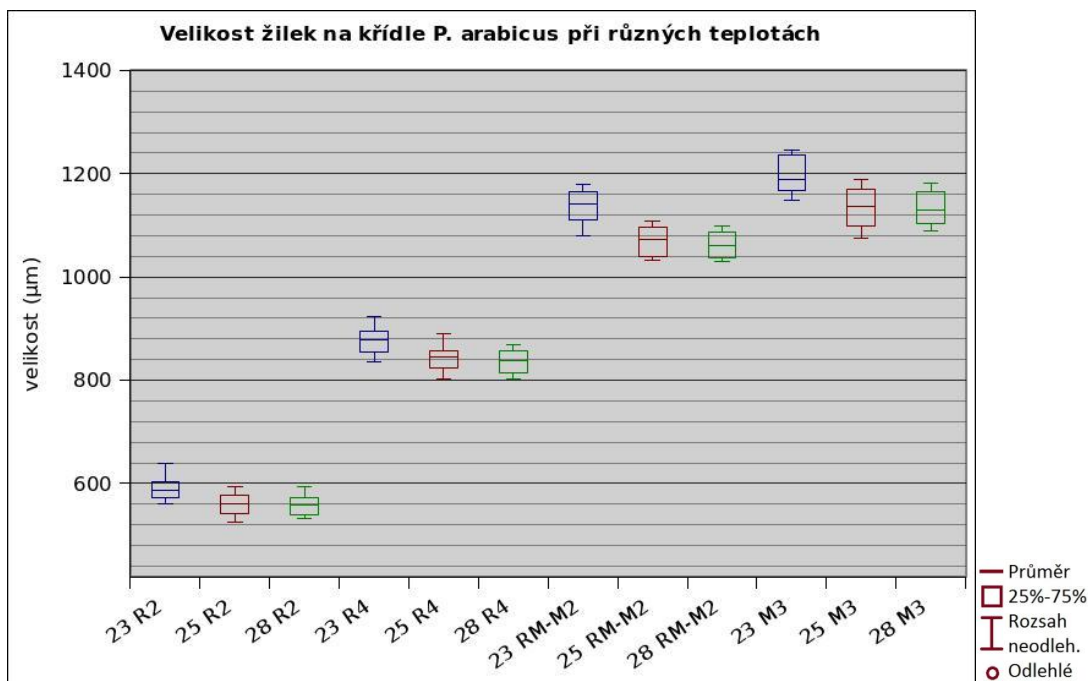
Výsledky měření délky žilek na křídlech *P. arabicus* při jednotlivých teplotách jsou shrnuty v tabulce 7-1.

Tab. 7-2: Srovnání velikosti žilek na křídlech *P. arabicus* při 23 °C (n = 93), 25 °C (n = 91) a 28 °C (n = 84).

23 °C	žilka	průměrná délka (μm)	medián (μm)	směrodatná odchylka
	R2	592	587	25
	R4	871	879	27
	RM-M2	1136	1142	36
	M3	1199	1190	41

25 °C	žilka	průměrná délka (μm)	medián (μm)	směrodatná odchylka
	R2	560	560	25
	R4	841	846	29
	RM-M2	1069	1072	32
	M3	1135	1137	45

28 °C	žilka	průměrná délka (μm)	medián (μm)	směrodatná odchylka
	R2	557	558	23
	R4	836	838	26
	RM-M2	1062	1061	30
	M3	1134	1130	37



Obr. 7-1: Srovnání velikosti jednotlivých žilek na křídle *P. arabicus* při teplotách 23 °C (n = 93), 25 °C (n = 91) a 28 °C (n = 84).

7.2 Srovnání velikosti genitálií

Usmrceným samcům ze skupin chovaných při 23, 25 a 28 °C byla oddělena terminální část zadečku s genitáliemi a po zpracování a zamontování do preparátu byly studované struktury změřeny pod mikroskopem. U obou coxitů byla vždy měřena délka, šířka, velikost pole chlupů, vzdálenost pole chlupů od konce coxitu a počet chlupů v poli. Naměřené šířky coxitu jsem se rozhodla statisticky nevyhodnocovat, protože by velikost mohla být zkreslena umístěním a případným pootočením coxitu v preparátu. Výsledky ostatních měření jsou shrnuty v tabulce 7-3. Nebyly zaznamenány rozdíly mezi pravým a levým coxitem (ANOVA 23 °C – $F(1, 90) = 0,01415$, $p = 0,90557$), (ANOVA 25 °C – $F(1, 78) = 0,22094$, $p = 0,63963$), (ANOVA 28 °C – $F(1, 106) = 0,06491$, $p = 0,79939$), nicméně srovnání nemohlo být provedeno u všech jedinců z důvodu špatné měřitelnosti jednoho coxitu v rámci páru (pouze u 65 – 72 % jedinců bylo možné vyhodnotit oba coxity). Výsledky naměřených velikostí částečně korelují s délkou larválního vývoje, při teplotě 23 °C byly struktury větší ve srovnání s 25 °C (ANOVA délka – $F(1, 145) = 152,85$, $p = 0,0000$), (ANOVA velikost pole chlupů – $F(1, 145) = 23,074$, $p = 0,00000$), (ANOVA vzdál. pole chlupů od konce coxitu – $F(1, 145) = 23,074$, $p = 0,00000$), při 25 °C a 28 °C nebyl rozdíl tak výrazný, nebyl zaznamenán rozdíl v délce coxitu (ANOVA délka

– $F(1, 142) = 2,9626$, $p = 0,08739$), pouze pole chlupů bylo významně větší při 28 °C (ANOVA velikost pole chlupů – $F(1, 142) = 21,866$, $p = 0,00001$), (ANOVA vzdál. pole chlupů od konce coxitu – $F(1, 142) = 0,44124$, $p = 0,50760$). Např. délka coxitu téměř nikdy nepřekročila 500 μm , což bylo při 23 °C naopak zcela běžné.

Celkově byl významný rozdíl ve velikosti všech určených parametrů na coxitu mezi všemi skupinami 23, 25 a 28 °C (ANOVA délka – $F(2, 216) = 95,782$, $p = 0,0000$), (ANOVA velikost pole chlupů – $F(2, 216) = 15,860$, $p = 0,00000$), (ANOVA vzdál. pole chlupů od konce coxitu – $F(2, 216) = 40,537$, $p = 0,00000$).

Počet chlupů v poli na coxitu nejevil významné rozdíly při jednotlivých teplotách, jak při srovnání při 23 °C a 25 °C (ANOVA počet chlupů – $F(1, 71) = 0,83182$, $p = 0,36483$), tak při srovnání při 25 °C a 28 °C (ANOVA počet chlupů – $F(1, 68) = 0,00705$, $p = 0,93335$). Rozdíly v rámci všech teplotních skupin též nebyly významné (ANOVA počet chlupů – $F(2, 106) = 0,51305$, $p = 0,60015$).

Tab. 7-3: Počet chlupů v poli na coxitu *P. arabicus* při 23 °C ($n = 39$), 25 °C ($n = 34$) a 28 °C ($n = 36$).

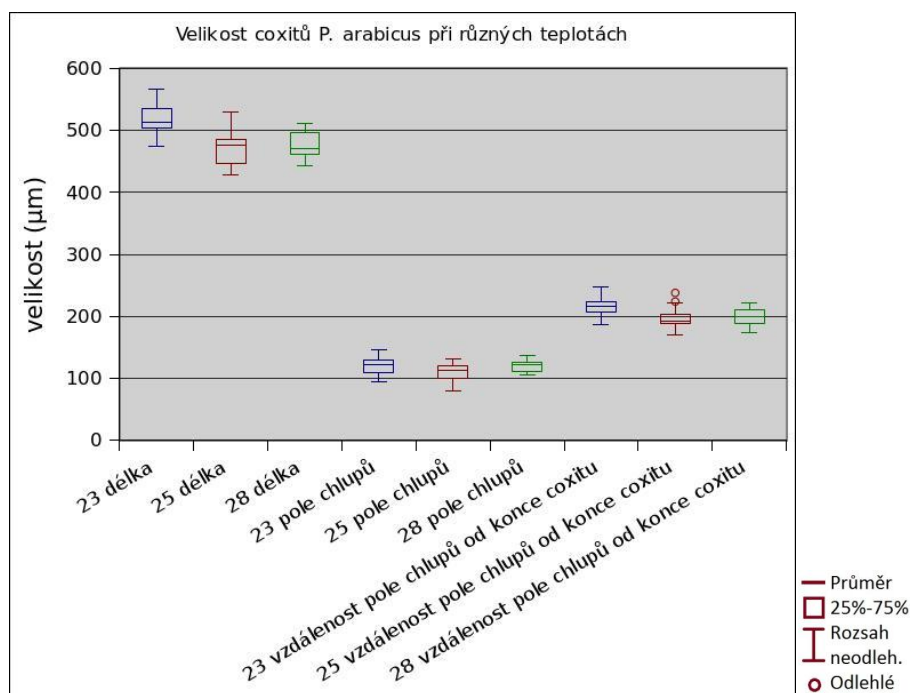
teplota	průměr	medián	směrodatná odchylka
23 °C	55,3	55	0,9
25 °C	54,9	55	2,5
28 °C	54,9	55	2,4

Tab. 7-4: Srovnání velikosti coxitů *P. arabicus* při 23 °C (n = 75), 25 °C (n = 73) a 28 °C (n = 72).

		průměrná délka (μm)	medián (μm)	směrodatná odchylka
23 °C	délka coxitu	519	514	24
	délka pole chlupů	120	123	13
	vzdálenost pole chlupů od konce coxitu	217	217	13

		průměrná délka (μm)	medián (μm)	směrodatná odchylka
25 °C	délka coxitu	469	476	26
	délka pole chlupů	111	113	13
	vzdálenost pole chlupů od konce coxitu	197	193	16

		průměrná délka (μm)	medián (μm)	směrodatná odchylka
28 °C	délka coxitu	476	471	23
	délka pole chlupů	120	122	10
	vzdálenost pole chlupů od konce coxitu	199	201	14



Obr. 7-2: Srovnání velikosti jednotlivých parametrů na coxitu *P. arabicus* při teplotách 23 °C (n = 75), 25 °C (n = 73) a 28 °C (n = 72).

8. DISKUZE

První tematická část této práce je věnována rotaci vnějších genitálií samců několika vybraných podrodů flebotomů a jejich zástupců. Rotace vnějších genitálií samců jistě plní nezbytnou funkci pro úspěšné páření, avšak tato práce se zaměřuje na aspekt, kterým rotace poskytuje výhodu při hledání líhnišť flebotomů a zabývá se též faktory, které by rotaci mohly ovlivňovat. Faiman et al. (2012), Moncaz et al. (2014) popisují způsob využití rotace genitálií pro vyhledávání líhnišť, přesto se zatím žádná studie systematicky nezabývá studiu doby nástupu a trvání této rotace, přitom by tyto informace mohly výrazně usnadnit hledání líhnišť flebotomů.

Nejprve byly měřeny doby trvání rotace u všech vybraných podrodů a jejich zástupců: *Adlerius* (*Phlebotomus arabicus*), *Larrousius* (*Phlebotomus orientalis* a *Phlebotomus tobbi*), *Euphlebotomus* (*Phlebotomus argentipes*), *Paraphlebotomus* (*Phlebotomus sergenti*), *Phlebotomus* (*Phlebotomus papatasi*), *Lutzomyia* (*Lutzomyia longipalpis*) a *Sergentomyia* (*Sergentomyia schwetzi*). Doba rotace se mezi studovanými podrody / druhy významně lišila. Nejkratší dobu rotace vykazoval druh *S. schwetzi* s průměrnými 12 hodinami (v rozmezí 9 až 17 hodin), přičemž 9 hodin byla vůbec nejkratší naměřená doba v rámci všech sledovaných druhů. Nejdelší dobou rotace vykazoval druh *P. sergenti* (*Paraphlebotomus*) s průměrnou dobou 32 hodin (v rozmezí 14 až 52 hodin), což se projevilo nejenom nejdelší dobou rotace (52 hodin), ale i největším rozptylem naměřených hodnot. *P. sergenti* je opakovaně popisován jako druh s vysokou vnitrodruhovou variabilitou, jak z hlediska morfologického, tak i genetického (Dvorak et al., 2011, Yaman et al., 2006). Přestože není doposud známo, zda je doba rotace podmíněna geneticky, variabilita u *P. sergenti* se projevuje i v době této rotace.

Faiman et al. (2012) lokalizovali líhniště *P. sergenti* na základě přítomnosti samců s dosud nerotovanými genitáliemi, avšak bez charakterizace doby této rotace. Samci s nerotovanými genitáliemi byli v jejich studii považováni za vylíhnuté téhož dne. Protože *P. sergenti* rotuje výrazně delší dobu než ostatní druhy, existuje velká šance zachytit nerotované samce i mimo líhniště. Naopak v případě druhů s krátkou dobou rotace (např. *S.*

schwetzi), může být i v blízkosti líhniště jen velmi malý podíl nerotovaných samců a může tedy snadněji dojít k mylnému dojmu, že se líhniště v blízkosti nenachází. Při hledání líhnišť flebotomů pomocí detekce podílu rotovaných a nerotovaných samců je přinejmenším velmi vhodné znát charakter jejich rotace.

Důležitou otázkou bylo, zda je doba rotace specifická pro jednotlivé druhy a případně zda je specifická i na úrovni podrodů. Pokud je mi známo, doposud se žádné studie nezabývaly dobou rotace u flebotomů, proto lze těžko druhovou specifitu potvrdit pouze na základě této pilotní práce. Jak již bylo uvedeno výše, u každého druhu z každého podrodu trvala rotace dobu odlišnou od ostatních studovaných zástupců (byla tedy druhově specifická). Protože každý druh náležel do jiného podrodu (s jednou výjimkou), byla doba rotace odlišná i v rámci podrodů. Abychom otestovali, zda je doba rotace specifická i pro podrody, otestovali jsme její dobu v rámci dvou druhů (*P. orientalis* a *P. tobbi*) náležících do stejného podrodu – *Larroussius*. Bohužel v době práce na této diplomové práci jsme v naší laboratoři neměli k dispozici více takovýchto dvojic, jejichž studium by mohlo napovědět více o obecnosti sledovaného jevu a o specifičnosti nebo naopak univerzálnosti doby rotace v rámci jednotlivých podrodů flebotomů. V rámci jediné studované dvojice flebotomů se doba rotace velmi výrazně lišila: *P. orientalis* rotoval přibližně o čtvrtinu času déle než *P. tobbi*. Významný rozdíl byl také v začátku doby rotace kdy *P. tobbi* začínal rotovat dva a půlkrát později než *P. orientalis* (2 versus 5 hodin po vylíhnutí). V rámci všech studovaných druhů flebotomů (rod *Phlebotomus*) začínala rotace u *P. orientalis* po vylíhnutí nejrychleji, naopak u *P. tobbi* nastupovala rotace nejpozději (2 versus 5 hodin po vylíhnutí). Tento značný rozdíl v začátku rotace by mohl být podmíněn geneticky a mohl by souviset s přírodními podmínkami, ve kterých se tyto druhy líhnou. Jak ale bylo opakovaně uvedeno v několika studiích (Felicangeli et al., 2004, Alexander et al., 2003), bližší informace o místech larválního vývoje zatím nejsou známy. Navíc se u *P. orientalis* objevují pravidelné diapauzy v larválním vývoji (Seblova et al., 2013), což by mohlo ovlivnit líhnutí i život dospělců. Také *P. tobbi* se projevuje jako druh citlivý na vnější podmínky, a proto může být snadněji ovlivněn různými faktory. Jediná podobnost u obou druhů byla zaznamenaná u celkové variability, která se téměř nelišila. Protože rozdíly mezi oběma druhy byly velmi významné, můžeme na základě této studie usuzovat, že doba rotace genitálií samců

flebotomů je pravděpodobně geneticky podmíněna a je druhově, nikoli však podrodově specifická.

V navazujících experimentech byl zjišťován vliv několika faktorů na rotaci genitálií. Zajímalo nás, zda má na dobu rotace vliv denní doba, ve které se dospělci vylíhli. Denní doba líhnutí není samostatným faktorem, jedná se spíše o souhru faktorů, jako jsou změny teploty, fotoperioda, tlak, vlhkost apod. Pro všechny studované druhy byla srovnávána doba rotace podle jednotlivých denních etap líhnutí a také pravidelnost líhnutí během dne. Líhnutí probíhalo kontinuálně v průběhu celého denního cyklu bez jakékoliv zaznamenané tendence. Samci se sice líhnou dříve než samice kvůli správnému načasování páření, protože teprve po plném dorotování genitálií se mohou samci pářit, naopak samice se mohou pářit již krátce po vylíhnutí. Samotné líhnutí však probíhá kontinuálně v průběhu všech denních etap jak u samic, tak u samců, což koresponduje s publikovanými výsledky (Dinesh et al., 2009). Denní dobou líhnutí nebyla ovlivněna ani průměrná doba rotace či její začátek u žádného ze zkoumaných druhů, pouze u *P. papatasi* byla zaznamenána vyšší variabilita doby rotace u jedinců vylíhnutých v odpoledních a večerních hodinách a pravděpodobně se jedná o náhodný jev.

V návaznosti na denní dobu líhnutí byl zjišťován vliv teploty na rotaci genitálií. Rotaci může ovlivňovat mnoho faktorů, exogenních i endogenních. Důležitým faktorem ovlivňující rotaci je nepochybně teplota. Zatím neexistují studie zabývající se vlivem teploty na rotaci genitálií u flebotomů, u komárů však byl tento faktor již studován. Provost et al. (1961) uvádí závislost rotace na okolní teplotě u *Aedes taeniorhynchus*, komáři mají ale oproti flebotomům larvální vývoj ve vodě (flebotomové jsou terestričtí) a čerstvě vylíhnutí dospělci komárů tedy poměrně rychle změni místo dosavadního vývoje a přecházejí do nového, zcela odlišného prostředí. Při přechodu z vody na souš se mění celá řada fyzikálních podmínek. Zatímco larvy flebotomů žijí v norách a puklinách, obecně v hlubších temných a vlhkých místech se stabilními podmínkami včetně teploty (Feliciangeli et al., 2014), kde se rovněž zdržují dospělci po vylíhnutí, a náhlý přechod do zcela jiných podmínek se v případě flebotomů nekoná.

Pro studium vlivu teploty na rotaci byl zvolen druh *P. papatasi*, pro jeho snadnou manipulovatelnost. Byly zvoleny teploty na okrajích optima 20 a 25 °C, přičemž vliv těchto

teplot se na rotaci neprojevil. Průměrná doba rotace byla u obou skupin stejná, při teplotě 25 °C se ale projevila výraznější variabilita (tj. rozptyl hodnot). Zvolené rozmezí teplot odpovídalo přirozeným podmínkám a i při extrémních teplotách by se pravděpodobně rozdíl v rychlosti rotace neobjevil, navíc při velmi nízkých teplotách by samci pravděpodobně nedosáhli plného dorotování. U vyšších teplot by rotace mohla být dokončena, protože *P. papatasi* je schopen přežívat i ve vyšších teplotách. Teplota ovlivňuje mnoho procesů u flebotomů (Benkova et al., 2007), ale rotace genitálií nejspíše teplotou ovlivněna není. Navíc flebotomové se v přirozených podmínkách vyvíjejí ve stálých podmínkách zvířecích nor, hlubokých puklin apod., a nejsou nejspíše výkyvům teplot vystaveni (Cross et al., 1996).

Druhá tematická část diplomové práce je věnována vlivu teploty na variabilitu velikosti těla a samčích genitálií flebotomů. Variabilita může být ovlivněna mnoha faktory a může se i různě projevit. Např. *P. sergenti* je mimojiné znám vysokou variabilitou včetně velikosti těla v rámci některých populací (Dvorak et al., 2006). Tato variabilita bude spíše podmíněna geneticky (Khalid et al., 2012).

Zaměřila jsem se na variabilitu u samců *P. arabicus* ovlivněnou vnějšími faktory, konkrétně teplotou. U třech skupin chovaných v rámci celého životního cyklu při 23, 25 a 28 °C byly pro měření zvoleny výrazné a dobře měřitelné struktury, coxita a křídlo. Křídla jsou uváděna jako nejvhodnější struktury pro měření velikosti (Dvorak et al., 2006), na kterých bylo zvoleno několik žilek, které byly porovnávány a na coxitu byla měřena délka, velikost pole chlupů, vzdálenost pole chlupů od konce coxity a počet chlupů. Coxity, stylety, chlupy na coxitu a styletu a další jsou důležitými taxonomickými znaky.

Nesmí být také opomenuto, že rozdíly ve velikosti křídel se mohou objevovat mezi pohlavími, přičemž samice mívají spíše delší a mohutnější křídla než samci, protože pouze samice jsou hematofágní a létají na větší vzdálenosti než samci (Killick-Kendrick et al., 1984). V této práci však byla měřena pouze křídla samců. Snahou bylo měřit u každého jedince vždy oba párové orgány, nicméně u coxit tento záměr nebyl zcela splněn pro špatnou měřitelnost některých preparátů (pouze u 65 – 72 % preparátů).

Skupina s nejnižší teplotou při larválním vývoji měla nejdelší vývoj oproti ostatním skupinám a prokazatelně větší rozměry obou měřených struktur, křídel i coxit. Teplota ovlivňuje rychlost vývoje vajec i všech larválních stádií (Benkova et al., 2007, Guzman et al.,

2000) a tím zkracuje nebo prodlužuje dobu, po kterou mohou larvy čerpat živiny. Následkem delšího larválního vývoje při nízké teplotě je větší velikost těla a naopak, při vyšších teplotách je rychlost vývoje vyšší a velikost těla menší. Což se projevilo i u další skupiny chované při 25 °C, která měla vždy menší rozměry křídel i coxitů než skupina chovaná v 23 (průměrně o 10 % větší coxity a až o 5 % delší křídla).

Skupina chovaná při 28 °C však tolik nekorespondovala s předchozím vzorcem. Velikosti coxitů a křídel již nebyly výrazně menší oproti skupině z 25 °C (průměrně o 2 % delší coxity a o 1 % delší křídla). Larvální vývoj se v přirozených podmínkách neodehrává při takto vysokých teplotách (Guzman et al., 2000), což by do jisté míry mohlo vysvětlovat, proč rozdíly již nebyly tak patrné, protože jsme se pravděpodobně dostali za hranici přirozených podmínek vývoje. Na druhou stranu, velikost těla má jistě svoje (spodní) hranice, za které se nelze dostat, aniž by bylo ovlivněno přežití jedinců. Jak si lze všimnout, rozdíly ve velikostech křídel mezi jednotlivými teplotními skupinami nejsou tak výrazné jako u coxitů, přestože křídla jsou mnohem větší strukturou než coxity, a byl tedy očekáván procentuálně větší (nebo alespoň srovnatelný) rozdíl ve velikostech. Jedno z možných vysvětlení této disproporce může souviset s výše popisovaným fenoménem všeobecně menších samčích křídel, která již nelze příliš zmenšovat. Odpověď na tuto otázku by tedy umožnila analýza rozdílů ve velikostech samičích křídel, ta však nebyla v rámci této studie zjišťována.

Byl také zjišťován vliv teploty na počet chlupů na coxitu, který je důležitým taxonomickým znakem. Počítání chlupů bylo obtížné, protože pole chlupů na coxitu *P. arabicus* je poměrně husté a polámané chlupy často překrývaly jamky, které nejsou samy o sobě moc výrazné. Z tohoto důvodu bylo pro toto měření mnoho preparátů vyřazeno. Závislost počtu chlupů na teplotě se nicméně vůbec neprojevila a rozdíly nebyly patrné mezi žádnou z teplotních skupin. Jak již bylo uvedeno, počet chlupů na coxitu s používá jako taxonomický znak, v případě ovlivnitelnosti teplotou nebo dalšími faktory by použitelnost tohoto znaku byla přinejmenším zpochybnitelná.

Dalším zajímavým projevem teploty larválního vývoje byla variabilita, která byla největší při 25 °C. Pro některé druhy je tato teplota optimem (Volf et al., 2011) a nejspíš se při této teplotě nejméně projevuje selekce na extrémní hodnoty a je tedy možné dosáhnout větší variability.

9. ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ

- Doba trvání rotace vnějších genitálií samců flebotomů se signifikantně lišila mezi sledovanými druhy a zdá se proto být druhově specifická. V rámci dvou druhů (*P. orientalis* a *P. tobbi*) jednoho podrodu (*Larroussius*) byly rovněž zjištěny signifikantní rozdíly, a proto lze předpokládat, že doba rotace genitálií v rámci podrodů nebude uniformní. Při studiu vnějších faktorů potencionálně ovlivňující dobu rotace bylo zjištěno následující:
 - Denní doba, ve které se dospělci vylíhli, žádným způsobem nekorelovala s dobou trvání rotace genitálií.
 - Rotace genitálií u modelového druhu *P. papatasi* nebyla ovlivněna teplotou (20, 23 a 25 °C), při nejvyšší teplotě se pouze projevila vyšší variabilita doby rotace.
- Velikost vnějších genitálií (coxitů) a křídel samců druhu *P. arabicus* byla ovlivněna teplotou, ve které probíhal larvální vývoj jedinců.
 - Při teplotě 23 °C měla křídla i coxity výrazně větší rozměry, což korelovalo s delší dobou larválního vývoje.
 - Při teplotě 25 °C křídla i coxity dosahovaly menších rozměrů a projevila se nejvyšší variabilita ve velikostech.
 - Při teplotě 28 °C se rozměry coxitů i křídel výrazně nelišily od 25 °C a variabilita velikostí zde byla celkově nejnižší.
 - Počet chlupů na coxitu je nezávislý na velikosti samce a jeho pohlavních struktur a může být proto použit jako jeden z hlavních determinačních znaků u podrodu *Adlerius*.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE, 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 24: 7–14.

Adler S, Theodor O, 1926. On the *minutus* group of the genus *Phlebotomus* in Palestine. *Bulletin of Entomological Research* 16: 399–405.

Alencar RB, Queiroz RG, Barrett TB, 2011. Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *Acta Tropica* 118: 204–208.

Alexander B, Maroli M, 2003. Control of phlebotominae sandflies. *Medical and veterinary entomology* 17: 1–18.

Benkova I, Volf P, 2007. Effect of Temperature on Metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 44: 150–154.

Bookstein FL, 1991. Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology. Cambridge University Press New York, 1991: 1–435.

Bray DP, Ward RD, Hamilton JGC, 2010. The chemical ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae). In *Ecology and Control of Vector-Borne Diseases. Volume 2. Olfaction In Vector-Host Interactions*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers 2010: 203–216.

Boussaa S, Perrotey S, Boumezzough A, Harrak R, Hilali S, Pesson B, 2008. Isoenzymatic characterization of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) of the Marrakech area, Morocco. *Journal of Medical Entomology* 45: 370–374.

Cross ER, Hyams KC, 1996. The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environmental Health Perspectives* 104: 724–727.

Cunha S, Freire M, Eulalio C, Critosvao J, Netto E, Johnson WD Jr, Reed SG, Badaro R, 1995. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Transactions of the Royal Tropical Medicine and Hygiene* 89: 155–158.

Dahan YL, Koekemoer L, 2014. Analysis of the genitalia rotation in the male *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* 132S: S20–S25.

Dantas-Torres F, 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors* 1: 25.

Dedet JP, 2005. Stages in the identification of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniasis and other tropical diseases. *Parassitologia* 47:291–295.

Depaquit J, Ferte H, Leger N, Lefranc F, Alves-Pires C, Hanafi H, Maroli M, Morillas-Marques F, Rioux JA, Svobodová M, Volf P, 2002. ITS2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): Possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology* 32: 1123–1131.

Dinesh DS, Singh A, Kumar V, Kesari S, Kumar A, Kishore K, Roy SP, Bhattacharya SK, Das P, 2009. Emergence periodicity of *Phlebotomus argentipes* annandale and brunetti (Diptera: psychodidae): A laboratory study. *Journal of Parasitic Diseases* 33: 23–27.

Dvorak V, Aytekin AM, Alten B, Skarupova S, Votypka J, Volf P, 2006. A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology* 31: 229–238.

Elnaiem DA, 2011. Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *Journal of Vector Ecology* 36: S23–S31.

Elnaiem DA, Ward RD, Hassan HK, Miles MA, Frame IA, 1998. Infection rates of *Leishmania donovani* in *Phlebotomus orientalis* from a focus of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92: 229–232.

Feliciangeli MD, 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 18: 71–80.

França C, Parrot L, 1921. Essai de classification des Phlébotomes. *Archives des Instituts Pasteur de l’Afrique du Nord* 1: 279-284.

Guernaoui S, Boumezzough A, 2009. Habitat preferences of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the southwestern Morocco. *Journal of Medical Entomology* 46: 1187–94.

Guzmán H, Tesh RB, 2000. Effects of temperature and diet on the growth and longevity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Biomedica* 20: 190–199.

Hostomska J, Volfova V, Mu J, Garfield M, Rohousova I, Volf P, Valenzuela JG, Jochim RC, 2009. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics* 10: 282.

Huber BA, Sinclair BJ, Schmitt M, 2007. The evolution of asymmetric genitalia in spiders and insects. *Biological Reviews* 82: 647–698.

Chavez T, Moreno J, Dujardin JP, 1999. Isoenzyme electrophoresis of *Rhodnius* species: a phenetic approach to relationships within the genus. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93: 299–307.

Chelbi I, Zhioua E, 2007. Biology of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology* 44: 597–600.

Chown SL, Klok CJ, 2003. Altitudinal body size clines: latitudinal effects associated with changing seasonality. *Ecography* 26: 445–455.

Ilango K, Lane RP, 2000. Coadaptation of Male Aedeagal Filaments and Female Spermathecal Ducts of the Old World Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 37: 653–659.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungruiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP, 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Tropical Medicine & International Health* 12: 1354–1360.

Khalid NM, Aboud MA, Alrabba FM, Elnaiem DEA, Tripet F, 2012. Evidence for genetic differentiation at the microgeographic scale in *Phlebotomus papatasi* populations from Sudan. *Parasites & Vectors* 5: 249.

Killick-Kenrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtli R, Ward RD, Gulivard E, Perieres J, Dubois M, 1984. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 59: 555–572.

Killick-Kendrick R, 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* 4: 1–24.

Killick-Kendrick R, 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology* 17: 279–289.

Kirk R, Lewis DJ, 1955. Studies in leishmaniasis in the Anglo-Egyptian Sudan. XI. *Phlebotomus* in relation to Leishmaniasis in the Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 229–240.

Lainson R, Shaw JJ, 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In *The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology* 1987: 1–120.

Lambert M, Dereure J, El-Safi SH, Bucheton B, Dessein B, Boni M, Feugier E, Dedet JP, 2002. The sandfly fauna in the visceral-leishmaniasis focus of Gedaref, in the Atbara-River area of eastern Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96: 631–636.

Lane RP, Crosskey RW, 1993. Medical insect and arachnids. 1993: 1–723.

Lewis DJ, 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology* 45: 121–209.

Mauricio IL, Stothart JR, Miles MA, 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology today* 16, 188–189.

Moncaz A, Faiman R, Kirstein O, Warburg A, 2012. Breeding Sites of *Phlebotomus sergenti*, the Sand Fly Vector of Cutaneous Leishmaniasis in the Judean Desert. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: 1725–1371.

Moncaz A, Kirstein O, Gabresellassie A, Lemma W, Yared S, Gebre-Michael T, Hailu A, Shenker M, Warburg A, 2012. Characterization of breeding sites of *Phlebotomus orientalis* – The vector of visceral leishmaniasis in northwestern Ethiopia. *Acta Tropica* 139: 5–14.

Mutinga MJ, Massamba NN, Basimike M, Kamau CC, Amimo FA, Onyido AE, Omogo DM, Kyai FM, Wachira DW, 1994. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: *Sergentomyia gardami* (Diptera Psychodidae), a possible vector of *Leishmania major* in Kitui District: a new focus of the disease. *East African Medical Journal* 71: 424–428.

Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press New York 1987: 1–512.

Orshan L, Szekely D, Khalfa Z, Bitton S, 2010. Distribution and Seasonality of *Phlebotomus* Sand Flies in Cutaneous Leishmaniasis Foci, Judean Desert, Israel. *Journal of Medical Entomology* 47: 319–328.

Picado A, Das ML, Kumar V, Dinesh DS, Rijal S, Singh SP, Das P, Coosemans M, Boelaert M, Davies C, 2010. *Phlebotomus argentipes* seasonal patterns in India and Nepal. Journal of Medical Entomology 47: 283–286.

Provost MW, Lum P, Branch N, 1961. Rotation of Male Terminalia in *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) as Affected by Temperature. Annals of the Entomological Society of America 54: 896–900.

Prudhomme J, Gunay F, Rahola N, Ouanaïmi F, Guernaoui S, Boumezzough A, Bañuls A, Sereno D, Alten B, 2012. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and northslopes of the Atlas Mountains in Morocco. Journal of Vector Ecology 37: 137–147.

Sadlova J, Dvorak V, Seblova V, Warburg A, Votypka J, Volf P, 2013. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. Parasites & Vectors 6:186.

Singh R, Lal S, Saxena VK, 2008. Breeding ecology of visceral leishmaniasis vector sandfly in Bihar state of India. Acta Tropica 107: 117–120.

Ranasinghe S, Maingon RDC, Bray DP, Ward RD, Udagedara C, Dissanayake M, Jayasuriya V, Silva NK, 2012. A morphologically distinct *Phlebotomus argentipes* population from active cutaneous leishmaniasis foci in central Sri Lanka. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 107: 402–409.

Ricklefs RE, Miles DB, 1994. Ecological and evolutionary inferences from morphology: an ecological perspective. Ecological Morphology. University of Chicago Press 1994: 13–41.

Rispail P, Léger N, 1998. Numerical Taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of Classification upon Subgeneric Morphological Characters. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 93: 787–793.

Rohlf FJ, 1999. On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 11: 1–17.

Schneider JR, Morrison AC, Astete H, Scott TW, Wilson ML, 2004. Adult size and distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) associated with larval habitats in Iquitos, Peru. *Journal of Medical Entomology* 41: 634–642.

Snodgrass ER, 1965. A textbook of arthropod anatomy str. 325–329.

Svobodova M, Votypka J, Peckova J, Dvorak V, Nasereddin A, Baneth G, Sztern J, Kravchenko V, Orr A, Meir D, Schnur LF, Volf P, Warburg A, 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1860–1868.

Seblova V, Volfova V, Dvorak V, Pruzinova K, Votypka J, Kassahun A, Gebre-Michael T, Hailu A, Warburg A, Volf P, 2013. *Phlebotomus orientalis* Sand Flies from Two Geographically Distant Ethiopian Localities: Biology, Genetic Analyses and Susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2187.

Uribe S, 1999. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species komplex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 729–734.

Vieira VP, Ferreira AL, dos Santos CB, Leite GR, Ferreira GEM, Falqueto A, 2012. Peridomiciliary Breeding Sites Of Phlebotominae Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Endemic Area Of American Cutaneous Leishmaniasis in Southeastern Brazil. *American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 1089–1093.

Volf P, Volfova V, 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36: S1–S9.

Wermelinger ED, Zanucio JC, 2001. Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. Brazilian Journal of Biology 61: 405–408.

Yaman, M., and B. Dik. 2006. An inventory of the phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) found in the Turkish province of Konya. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 100: 265–275.

Sekundární zdroje literatury:

Dordel HJ, 1973. Funktionsanatomische Untersuchungen über die Abdomentorsion bei der männlichen Imago von *Clunio marinus* Haliday (Diptera, Chironomidae). Zeitschrift für Morphologie der Tiere 75: 165–221.

McCombie-Young TC, Richmond AE, Brendish GR, 1926. Sandflies and sandfly fever in the Peshawar District. *Indian Journal of Medical Research* 13: 961–1021.

Hanson WJ, 1961. The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera: Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 54, 317–322.

Newstead R, 1911. The papataci flies (*Phlebotomus*) of the Maltese islands. *Bulletin of Entomological Research* 2: 47–78.

Schmidt ML, Schmidt JR, 1963. A morphologic study of *Phlebotomus papatasi* from Egypt (Diptera: Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 56: 567–573.

Young DG, Arias JA, 1992. Flebótomos: vectores de leishmaniasis en las Américas, Organización Panamericana de la Salud, Technical Report No. 33.